

## Анатолию Николаевичу Буркову - 50 лет!

Исполняется 50 лет со дня рождения известного российского предпринимателя, председателя совета директоров ООО "Научно-производственное объединение "Диагностические системы", доктора медицинских наук, профессора, Анатолия Николаевича Буркова.

Анатолий Николаевич родился 7 сентября 1958 года в г. Зуевка Кировской области. В 1981 году окончил Горьковский медицинский институт им. С.М.Кирова по специальности "врач-гигиенист, эпидемиолог". Свою профессиональную деятельность начал с 1981 года в научно-производственном объединении "Восток". С 1987 по 1990г.г. работал в Горьковском НИИ эпидемиологии и микробиологии, сначала в должности научного сотрудника, затем заместителя директора института. В 1991 году А. Н. Бурков создал и возглавил ООО "Научно-производственное объединение "Диагностические системы", основными направлениями деятельности которого являются научная разработка и промышленный выпуск иммуноферментных тест-систем для диагностики инфекционных и соматических заболеваний.

Компания создавалась в трудные перестроечные годы, с очень незначительными "стартовыми" позициями и за 17 лет, во многом благодаря целеустремленности, неиссякаемой энергии, исключительной ответственности и высокой работоспособности ее руководителя, превратилась в крупнейшее предприятие на рынке медицинских иммунобиологических препаратов. На протяжении десяти лет ООО "НПО "Диагностические системы" планомерно обеспечивает выполнение заказов для государственных нужд на поставку диагностических тест-систем в рамках реализации приоритетных национальных проектов в сфере здравоохранения.

Органично сочетая предпринимательскую и научную деятельность, Анатолий Николаевич является настоящим тружеником науки, активным участником научных и технологических изысканий. На основе анализа экономических и биотехнологических факторов он разработал системный подход к созданию иммуноферментных тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний на основе рекомбинантных антигенов. В 2002 году А.Н.Бурков защитил докторскую диссертацию "Методология конструирования коммерческих тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний". Предложенный им метод конструирования иммуноферментных тест-систем внедрен на предприятии и широко используется при их разработке и промышленном выпуске. Анатолий Николаевич - автор ряда патентов, десятков нормативных, около 150 методических и научных работ, опубликованных в ведущих отечественных и зарубежных изданиях.

А.Н.Бурков осуществляет общее руководство и координирование научно-исследовательской и инновационной деятельностью компании, вносит большой вклад в развитие и укрепление научного и интеллектуального потенциала компании, повышение эффективности ее работы. В возглавляемом им коллективе трудятся 6 докторов и 18 кандидатов медицинских и биологических наук. Разработка и создание диагностических тест-систем базируются на новейших достижениях в области иммунохимии и геной инженерии. Большинство разработок являются уникальными и защищены авторскими свидетельствами и патентами; специалисты компании являются авторами многочисленных научных статей.

Многие научно-исследовательские работы компании проводятся в сотрудничестве с рядом ведущих отечественных и зарубежных центров и НИИ: Институтом иммунологии РАМН, Центром биотехнологии РАМН, Государственным институтом стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича, Центральным научно-исследовательским кожно-венерологическим институтом, Центральным институтом гематологии. С 1993 года компания участвует в совместных научных проектах с Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, Атланта, США). К участию в проектах такого рода привлекаются также молодые,

инициативные и перспективные сотрудники компании; многие из них проходят долгосрочную стажировку за рубежом (в CDC). Специалисты ООО "НПО "Диагностические системы" постоянно принимают участие в работе российских и международных съездов, конгрессов, конференций. На базе ООО "НПО "Диагностические системы" организован Нижегородский институт прикладной биотехнологии. Все научно-исследовательские проекты в компании осуществляются при активной поддержке и непосредственном участии Анатолия Николаевича Буркова.

С 2005 года по инициативе А.Н. Буркова ежеквартально издается информационно-реферативный журнал "Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний", в котором публикуются рефераты и статьи российских и зарубежных ученых по актуальным вопросам диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Цель издания журнала - решить проблему "информационного голода", образовавшуюся в постсоциалистические годы, когда были закрыты реферативные издания по различным отраслям науки и техники. Журнал предназначен для широкого круга практикующих врачей, специалистов лабораторной медицины, научных работников медико-биологического профиля. Анатолий Николаевич является не только организатором создания нашего журнала, но и его бессменным главным редактором. По решению А.Н. Буркова журнал издается на средства компании и распространяется адресно по бесплатной подписке среди постоянных потребителей продукции компании.

Анатолий Николаевич Бурков является одним из самых опытных менеджеров российской биотехнологической отрасли, получившим международное признание и известность. Его высокий профессионализм, богатый опыт научной работы, уникальные предпринимательские способности и большой вклад в развитие отечественных медицинских биотехнологий отмечены достойными наградами.

Анатолий Николаевич - Действительный член Международной академии реальной экономики, член Комиссии по де бюрократизации экономики Экспертного управления Администрации президента РФ, Почетный член Академии качества и маркетинга, Академик Международной Академии Исследования Бизнеса и Финансов. Международным академическим аккредитационным и аттестационным комитетом (МАААК) ему присвоено звание доктора делового администрирования. Кавалер ордена "Меценат" международного фонда "Меценаты столетия". Награжден дипломами "Человек года", "Золотой Олимп", нагрудным знаком "За честь и доблесть", орденами "За честь, доблесть, созидание, милосердие", "Слава нации", "Финансовая доблесть России", медалью "За заслуги в развитии медицины и здравоохранения", медалью ордена "За службу Отечеству - за заслуги перед Государством и обществом", является лауреатом международной премии "Профессия - жизнь" в номинации за достижения в области медицинского производства. За значительные профессиональные достижения и деловую репутацию награжден медалью "Профессионал России".

Возглавляемое доктором медицинских наук, профессором Анатолием Николаевичем Бурковым ООО "Научно-производственное объединение "Диагностические системы" является в настоящее время одним из крупнейших в России производителей диагностических иммунобиологических препаратов и представляет собой перспективную, стабильно развивающуюся компанию, обладающую инновационными технологиями и конкурентоспособной продукцией на внутреннем и зарубежных рынках.

Редакционная коллегия журнала "Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний" и его постоянные читатели сердечно поздравляют Анатолия Николаевича с юбилеем, желают ему крепкого здоровья, благополучия, душевной гармонии, огромного жизненного оптимизма и новых творческих успехов!

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

№ 2-3  
2008

ИНФОРМАЦИОННО-РЕФЕРАТИВНЫЙ ЖУРНАЛ

## ОГЛАВЛЕНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.П. Обрядина, Ю.Е. Загрядская, Н.В. Савельева, В.К. Пименов,  
В.Ф. Пузырёв, А.Н. Бурков, Т.И. Уланова

"Изучение диагностического потенциала различных областей гликопротеина E  
вируса клещевого энцефалита"

4

Н.Е.Сенягина, В.В.Зорин

"Клинико-эпидемиологическая оценка результатов серологической диагностики  
HSV-инфекции на современном этапе"

8

### РЕФЕРАТИВНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

#### Общий раздел

(социальная информация, статистика, эпидемиология)

11

#### Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний

Инфекции ToRCH-комплекса

14

— Токсоплазмоз

14

— Инфекции, вызываемые цитомегаловирусом

16

#### Сифилис

18

#### ВИЧ-инфекция

26

#### Бактериальные инфекции

33

#### Лабораторная диагностика неинфекционных заболеваний

38

— Патология щитовидной железы

38

— Онкологические заболевания

44

#### Вопросы качества лабораторных исследований

46

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор: А.Н. Бурков

А.П. Обрядина, Е.О. Копнина, М.В. Кувшинов, Е.Е. Шальнова, Р.А. Плохов, И.Ф. Голубева, Н.В. Фисенко, Д.М. Куцепина

Художественный редактор/компьютерная верстка: Н.Б. Цыганова

Адрес редакции, издательства, типографии

РОССИЯ, 603093, Н. Новгород, ул. Яблоневая, 22, а/я 69

Тел./факс (831) 434-86-83, 467-82-18

E-mail: see@npods.ru; www.npods.ru

Регистрационное свидетельство ПИ №ФС 77-228449 от 30 декабря 2005 г

Подписано в печать 01.09.2008

Тираж 3000 экземпляров.

Распространяется бесплатно. Коммерческое использование запрещено.

# Изучение диагностического потенциала различных областей гликопротеина E вируса клещевого энцефалита

ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород

**А.П. Обрядина**  
**Ю.Е. Загрядская**  
**Н.В. Савельева**  
**В.К. Пименов**  
**В.Ф. Пузырёв**  
**А.Н. Бурков**  
**Т.И. Уланова**

С целью определения потенциальных диагностически значимых антигенных кластеров проводили анализ белковой последовательности гликопротеина E вируса клещевого энцефалита с использованием биоинформационных методов. Пять выбранных участков аминокислотной последовательности белка E были ретранслированы в нуклеиновые последовательности с использованием оптимального кода для *E. coli*. Полученные фрагменты ДНК собирали методом ПЦР из синтетических олигонуклеотидов и экспрессировали в клетках *E. coli*. Рекомбинантный антиген, воспроизводящий область с 296 по 414 аминокислоту, продемонстрировал наиболее выраженную антигенную активность. Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования данного рекомбинантного белка при создании диагностического теста.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** вирус клещевого энцефалита, гликопротеин E, рекомбинантные белки, антигенность.

Bioinformation techniques were used to analyze envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus in order to determine the potential diagnostically significant antigenic clusters. Five selected regions of the amino acid sequence of protein E were retranslated in nucleic sequences, by employing the optimum code for *E. coli*. The resultant DNA fragments were synthesized by polymerase chain reaction from synthetic oligonucleotides and expressed in *E. coli* cells. The recombinant antigen replicating the region from 296 to 414 aminoacids demonstrated the most significant antigenic activity. The findings lead to the conclusion that this recombinant protein may be considered as a candidate for the development of a diagnostic assay.

**К е y w o r d s:** tick-borne encephalitis virus, envelope glycoprotein, recombinant protein, antigenic properties.

## РЕЗЮМЕ

Клещевой энцефалит - вирусная инфекция, поражающая отделы головного и спинного мозга ЦНС, периферические нервы, приводящая к развитию парезов и параличей [1].

Показатель заболеваемости населения клещевым энцефалитом в России и странах ближнего зарубежья демонстрирует тенденцию к росту в течение многих лет [1, 8, 10-12, 15]. Летальность в европейской части России в разные годы составляла 1-3%, а на Дальнем Востоке смертельные исходы наступали у 12-25% заболевших [1, 9]. Рост заболеваемости клещевым энцефалитом в России связан не только с увеличением численности неиммунного населения, часто контактирующего с природой, но и с ростом показателей зараженности клещей вирусом [1]. В связи с вышесказанным, очевидным является необходимость развития средств мониторинга инфекции для выявления инфицирования вирусом и установления диагноза клещевого энцефалита.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является одним из наиболее патогенных представителей семейства *Flaviviridae*. Вирион имеет

сферическую форму диаметром до 50-60 нм. В его состав входят структурные белки С, М и Е, различающиеся по размерам, функциям и локализации [13]. Поверхностный гликопротеин Е играет центральную роль в процессах проникновения вируса в клетку и является одним из основных иммуногенов ВКЭ [16].

Для выявления инфицирования вирусом и установления диагноза клещевого энцефалита повсеместно используются лабораторные методы иммуноферментного анализа (ИФА) антигенов ВКЭ и антител к ним в сыворотке крови пациента. Эти анализы основаны на реакции взаимодействия антиген-антитело с применением меченных ферментом антител для индикации результатов, где в качестве антигена используются вирусные частицы, полученные главным образом культуральными методами, а также белок Е, выделенный из культурального антигена [1].

Задачей данного исследования было выявление потенциальных диагностически значимых антигенных областей гликопротеина Е, их клонирование и экспрессия в *E. coli*, а также оценка в ИФА.

## ВВЕДЕНИЕ

Статья опубликована в "Вопросы вирусологии" 2008г. - №1 С. 36-38

МАТЕРИАЛЫ  
И МЕТОДЫ

**Анализ последовательностей.** Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей проводили с использованием on-line приложения NCBI Blast и пакета программ DNASTar Lasergene (Windows версия; DNASTAR Inc., Madison, WI).

**Синтез и экспрессия фрагментов гена, кодирующего белок E ВКЭ.** Фрагменты гена собирали из синтетических олигонуклеотидов с помощью ПЦР. Для амплификации нуклеотидных последовательностей использовали 5 пар праймеров. Продукты ПЦР клонировали по сайтам рестрикции BamH I и Xho I в экспрессирующие векторы pGEX 4T-2 ("Pharmacia", США) и pET-41a ("Novagen", США), полилинкер которых содержит аналогичные сайты. Трансформацию штаммов *E. coli* BL21(DE3) ("Novagen", США), JM 109 ("Promega", США) и экспрессию генов проводили по ранее описанной методике [5].

**Очистка рекомбинантных белков.** Рекомбинантные протеины - гибриды с глутатион-S-трансферазой (pGEX 4T-2) и GST/6His-tag (pET-41a) очищали методом аффинной и металлохелатной хроматографии - глутатионсефарозой 4В ("Amersham Biosciences", США) и Ni-NTA ("QIAGEN", Германия), соответственно). Использовали протоколы, рекомендуемые производителями хроматографических смол: аффинную хроматографию в нативных условиях; металлохелатную хроматографию в денатурирующих условиях. Степень чистоты полученных фракций оценивали с помощью электрофореза белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Концентрацию протеинов определяли спектрофотометрически с использованием метода М. Бредфорд [6].

**ИФА.** Иммунологическую активность фрагментов гликопротеина E оценивали с помощью

ИФА. Анализ проводили в 96-луночных планшетах для ИФА (Nunc, F8 MaxiSorb, Дания).

Рекомбинантные антигены разводили до концентрации 5 мкг/мл карбонат-бикарбонатным буфером (0,02 М, pH 9,6). Сорбированные антигены инкубировали в течение 20 ч при 20-22°C.

Планшеты с иммобилизованными рекомбинантными антигенами перед проведением ИФА промывали 2 раза раствором ФСП-Т (0,01 М фосфатный буфер с pH 7,5, содержащий 0,15 М натрия хлористого и 0,05% твина-20). Затем в лунки планшетов вносили предварительно разведенные в 10 раз раствором ФСП-Т образцы сыворотки крови и инкубировали в термостате 30 мин при температуре 37°C.

В качестве положительных использовали 15 образцов сывороток крови, содержащих антитела класса G к ВКЭ (рандомизированная выборка из коллекции, любезно предоставленной Екатеринбургским областным центром государственного эпиднадзора). В качестве отрицательных использовали 15 образцов сывороток крови здоровых доноров.

После инкубации планшеты промывали 4 раза раствором ФСП-Т. Затем в лунки вносили конъюгат антител козы к IgG человека с пероксидазой хрена ("Pierce", США), разведенный в 20 000 раз раствором ФСП-Т и снова инкубировали в термостате 30 мин при 37°C.

После инкубации планшеты промывали 4 раза раствором ФСП-Т. Затем в лунки вносили раствор ТМБ и инкубировали 20 мин в темном месте при комнатной температуре. Далее в лунки добавляли раствор серной кислоты (0,7М) и через 2-3 мин проводили учет результатов ИФА с помощью ИФА-анализатора Multiscan EX ("Flow", Финляндия) при длине волны 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И  
ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ аминокислотной последовательности белка E (штамм Софьин) с помощью программы Protean (DNASTar) (индекс антигенности по Jameson-Wolf, гидрофильность по Kyte-Doolittle, веро-

ятность нахождения на поверхности по Emini) показал наличие ряда потенциальных антигенных кластеров в N-концевой, центральной и C-концевой частях белковой молекулы (см. рисунок).

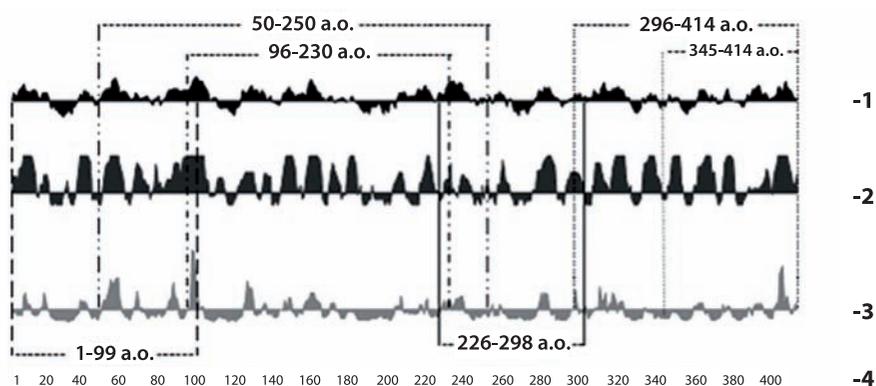


Рис. Анализ белка E вируса клещевого энцефалита, выполненный с помощью программы Protean (DNASTar).

1 - гидрофильность (Kyte-Doolittle); 2 - антигенный индекс (Jameson-Wolf); 3 - вероятность нахождения на поверхности (Emini); 4 - аминокислоты

Согласно данным литературы в этих областях белка E при помощи пептидного картирования идентифицированы иммуноактивные участки (аминокислотные остатки - а. о.): 1-22-й, 35-51-й, 48-74-й, 98-113-й, 204-224-й, 221-240-й, 275-302-й, 377-403-й, 394-403-й [1-3, 14]. По данным А.В. Локтева и соавт. аминокислоты R73, C74, T76, M77, N103, C105, L107, S112 входят в состав конформационной антигенной детерминанты [4]. Присутствие ряда эпитопов показано в регионе 78-176 (а. о.). Фрагмент белка E включает в себя часть консервативной области структуры, стабилизированной S-S-мостиками и вариабельный участок, не содержащий цистеиновых остатков [7].

Для синтеза рекомбинантных протеинов нами были выбраны следующие фрагменты (в

аминокислотах): 1-99-я, 96-230-я, 226-298-я, частично перекрывающие их области: 50-250-я, 296-414-я и 345-414-я.

Аминокислотные последовательности были ретранслированы с использованием оптимального кода для *E. coli* в нуклеиновые для дизайна синтетических олигонуклеотидов.

Рекомбинантные белки, растворимость которых позволяла экстрагировать их в нативных условиях, получали методом аффинной хроматографии. В качестве косольвента использовали N-лаурилсаркозин в концентрации 0,5%. Нерастворимые в нативных условиях рекомбинантные белки очищали в денатурирующих условиях металлохелатной хроматографией по протоколам, рекомендуемым производителями хроматографической смолы.

### Оценка антигенных свойств рекомбинантных антигенов, содержащих различные фрагменты последовательности белка E ВКЭ.

Группа обследованных	Рекомбинантные антигены, воспроизводящие фрагменты белка E (а.о.)					
	1-99	96-230	50-250	226-298	296-414	345-414
Содержащие антитела к ВКЭ (n=15)	28,3%*	46,6%	40,0%	13,3%	100,0%	0%
Не содержащие антитела к ВКЭ (n=15)	6,7%**	13,3%	6,7%	6,7%	0%	13,3%

Примечание: \* - доля сывороток, для которых получен положительный результат с соответствующим антигеном в данном тесте, от общего количества позитивных сывороток;

\*\* - доля сывороток, не содержащих антитела к ВКЭ, для которых получен положительный результат с соответствующим антигеном в данном тесте, от общего количества исследованных отрицательных образцов.

В таблице представлены результаты оценки антигенных свойств 5 рекомбинантных протеинов, воспроизводящих различные участки белка E ВКЭ. Рекомбинантный белок, содержащий последовательность 296-414-й а. о. белка E, обладает наиболее выраженными антигенными свойствами. Чувствительность и специфичность определения анти-ВКЭ с помощью этого антигена в исследованных образцах сывороток крови составила 100,0%. Полученный нами результат коррелирует с литературными данными о локализации в этой области белка E участков, проявляющих иммунохимическую активность при сохранении дисульфидного мостика [1, 17]. Интересно, что рекомбинантный антиген, содержащий последовательность 345-414-й а. о., не проявляет какой-либо специфической активности. Это может быть связано с тем, что иммунодоминантный эпитоп (ы) локализован в области, не вошедшей в этот антиген, или составляющие его аминокислоты лишь частично представлены в фрагменте 345-414-й а.о.

Для остальных четырех вариантов рекомби-

нантных протеинов результаты по специфичности анти-ВКЭ составили от 13% до 46%. Низкая специфическая активность рекомбинантных белков 1-99-й, 96-230-й, 226-298-й и 50-250-й а. о., возможно, объясняется тем, что третичная структура рекомбинантного антигена может отличаться от структуры нативного, и присутствующие в данной области эпитопы недостаточно эффективно экспонируются на поверхности рекомбинантного белка.

Высокая способность рекомбинантного протеина, воспроизводящего область с 296-й по 414-ю аминокислоту белка E ВКЭ, распознавать антитела к ВКЭ в сыворотке крови позволяет применять его в качестве основы для создания высокочувствительного диагностического теста заболевания. Это несомненное преимущество перед использованием культурального антигена в большинстве иммуноферментных тест-систем. Простота и безопасность получения больших количеств рекомбинантного белка в системе экспрессии *E. coli* также делают предпочтительным для применения в производстве диагностических тестов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аммосов А.Д. Клещевой энцефалит - Кольцово, 2002 // [www.vector-best.ru/brosh/tick\\_born.htm](http://www.vector-best.ru/brosh/tick_born.htm).
2. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Иванов В.Т. и др. Изучение антигенной структуры вируса клещевого энцефалита с помощью синтетических пептидов // *Биоорганическая химия*. - 1998. - Т. 24, №2. - С. 100-111.
3. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Жмак М.Н. и др. Синтез, иммуногенные и антигенные свойства фрагментов гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита // *Биоорганическая химия*. - 2001. - Т. 27, №3. - С. 174-179.
4. Локтев А.В., Кувшинов В.Н., Меламед Н.В. и др. Локализация антигенной детерминанты белка Е вируса клещевого энцефалита, узнаваемой антигемагглютинирующими моноклональными антителами, с помощью пептидной фаговой библиотеки // *Вопросы вирусологии*. - 2002. - №2. - С. 31-34.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М, 1984.
6. Скоупс Р. Методы очистки белков. - М., 1985.
7. Цехановская Н.А., Матвеев Л.Э., Плетнев А.Г. и др. Локализация антигенного участка белка оболочки вируса клещевого энцефалита с использованием моноклональных антител // *Биоорганическая химия*. - 1991. - Т. 17, №3. - С. 334-342.
8. Dobler G., Wolfel R., Schmuser H. et al. Sero-prevalence of tick-borne and mosquito-borne arboviruses in European brown hares in Northern and Western Germany // *Int. J. Med. Microbiol.* - 2006. - Vol. 296. - P.80-83.
9. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // *J. Gen. Virol.* - 1999. - Vol.80. - P. 179-185.
10. Grzeszczuk A., Ziarko S., Kovalchuk O., Stanczak J. Etiology of tick-borne febrile illnesses in adult residents of North-Eastern Poland: report from a prospective clinical study // *Int. J. Med. Microbiol.* - 2006. - Vol. 296. - P. 242-249.
11. Haglund M., Vene S., Forsgren M. et al. Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden // *J. Med. Virol.* - 2003. - Vol. 71. - P. 610-621.
12. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H. et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia // *J. Gen. Virol.* - 1999. - Vol.80. - P. 3127-3135.
13. Heinz F.X., Tuma W., Kunz Ch. Antigenic and immunogenic properties of defined physical forms of Tick-Borne Encephalitis virus structural proteins // *Infect. and immun.* - 1981. - Vol. 33. - N 2. - P. 250-257.
14. Holzmann H., Utter G., Norrby E. Assessment of the antigenic structure of tick-borne encephalitis virus by the use of synthetic peptides // *J. Gen. Virol.* - 1993. - Vol. 74. - N 9. P. 2031-2035.
15. Lundkvist K., Vene S., Golovljova I. et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes // *J. Med. Virol.* - 2001. - Dec. - Vol.65. - N.4. - P.730-735.
16. Mandl C.W., Guirakhoo F., Holzmann H. et al. Antigenic structure of the Flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as model // *J. Virol.* - 1989. - Vol. 63. - P. 564-571.
17. Winkler G., Heinz F.X., Kunz C. Characterization of a disulphide bridge-stabilized antigenic domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein // *J. Gen. Virol.* - 1987. - Vol. 68. - N 8. - P. 2239-2244.

## Клинико-эпидемиологическая оценка результатов серологической диагностики HCV-инфекции на современном этапе.

ГОУ ВПО НижГМА Росздрава, кафедра детских инфекций, детский гепатологический центр, Нижний Новгород

Н.Е.Сенягина  
В.В.Зорин

По данным ВОЗ в настоящее время в разных странах мира вирусом гепатита С инфицировано более 300 млн. человек [1]. В России официальная регистрация заболевания проводится с 1994 года. Количество лиц, у которых выявлены антитела к HCV, превышает 2 млн. человек [1].

Общепринятые меры профилактики (тестирование препаратов крови, разовый инструментарий, санитарно-противоэпидемический режим в ЛПУ) хотя и замедлили рост числа инфицированных, но не решили проблему эпидемического подъема HCV-инфекции в Российской Федерации.

В связи с тем, что возросло количество случаев заражения вирусом гепатита С, связанных с внутривенным введением наркотических веществ; в возрастном составе заболевших гепатитом С преобладают подростки от 15 до 19 лет (70-80%) и молодые взрослые, среди которых регистрируются максимальные показатели заболеваемости [2, 3]. Кроме того, в последние годы отмечается интенсивное вовлечение в эпидемический процесс детей 11-14 лет с преобладанием у них инфицирования в результате как внутривенного употребления психоактивных веществ, так и выполнения вошедших в моду татуировок и пирсинга [2,3,4]. Растет также и число беременных женщин, инфицированных HCV, в связи с чем прогнозируется дальнейший рост числа детей с перинатальной передачей инфекции [3, 4].

Однако приведенные данные статистики не отражают истинную заболеваемость гепатитом С как у взрослого населения, так и у детей, поскольку у подавляющего большинства больных острой HCV-инфекцией заболевание протекает в безжелтушной форме с минимальной клинической симптоматикой и, как правило, остается не диагностированным [2,4]. С другой стороны, в ряде случаев имеет место гипердиагностика заболевания.

В Российской Федерации в соответствии с формой федерального государственного статистического наблюдения "Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях" (форма №2) проводится регистрация заболеваемости вирусным гепатитом С согласно трем диагнозам:

1. Носительство анти-HCV;
2. Острый вирусный гепатит С;
3. Впервые выявленный хронический вирусный гепатит С.

При этом заслуживает внимания факт увеличения общей заболеваемости вирусным гепатитом С с ростом числа так называемых "носителей" на фоне снижения количества больных острым вирусным гепатитом С [4].

В настоящее время официальная регистрация "носительства" проводится лишь на основании данных серологического обследования пациента (первичное выявление анти-HCV). При этом не учитываются результаты клинического обследования и, как правило, отсутствует результат определения РНК HCV.

В эту категорию попадают как больные с различными формами HCV-инфекции, так и не имеющие заболевания (дети, рожденные от инфицированных матерей, имеющие трансплацентарные материнские антитела; пациенты, с ложноположительными результатами), а также пациенты с так называемыми "неопределенными" результатами серологического обследования).

Кроме того, у одного и того же пациента анти-HCV могут регистрироваться повторно; довольно часто отсутствует заключительный клинический диагноз.

Определение серологических маркеров при вирусном гепатите С имеет большое значение для постановки диагноза, разграничения острого гепатита С от хронического, определения активности вирусной репликации.

В настоящее время для серологической диагностики вирусного гепатита С используются метод иммуноферментного анализа (ИФА) и метод иммуноблотинга (Westernblot).

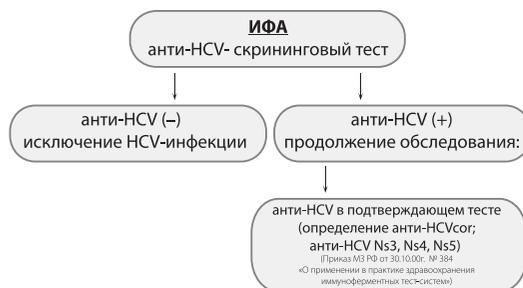
### Возможности и клиническое значение серологических методов на современном этапе.

1. Определение антител класса М и G к отдельным вирусным антигенам (анти-HCVcorIgM, IgG; анти-HCVNs3IgM, IgG; анти-HCVNs4IgM, IgG; анти-HCVNs5IgM, IgG)

- диагностика HCV-инфекции
- определение активности инфекционного процесса
- оценка течения инфекционного процесса в динамике

- оценка эффективности противовирусной терапии
  - ранняя диагностика инфекции при перинатальном инфицировании
2. Определение avidности анти-HCV IgG
    - диагностика острой HCV-инфекции
    - дифференциальная диагностика острого и хронического вирусного гепатита С
  3. Выявление антигена вируса гепатита С (corAg) и анти-HCV
    - ранняя диагностика HCV-инфекции в фазу «серонегативного окна» (на 5-7 день после инфицирования)

#### Алгоритм серологического обследования пациентов на наличие HCV-инфекции



Необходимо учитывать, что в ряде случаев, отрицательные результаты скринингового теста не исключают наличие инфекции. У пациента возможно наличие как острой инфекции в фазе серологического окна, так и хронической инфекции с отсутствием специфического антителообразования, как правило, на фоне наличия имеющейся иммуносупрессии. При отрицательном результате подтверждающего теста дальнейшее обследование должно проводиться при наличии клинических или эпидемиологических показаний.

Наиболее проблемную группу представляют больные с выявленными в подтверждающем тесте изолированными антителами к одному из белков вируса гепатита С (анти-HCVcor, анти-HCVNs3, анти-HCVNs4, анти-HCVNs5). В данном случае имеет место так называемый "неопределенный" результат [1]. Понятие "неопределенный" результат было озвучено Российским консенсусом по вирусному гепатиту С в 2000г. [1]. Несмотря на то, что речь идет о лабораторной диагностике, важна, в первую очередь, клиническая оценка данной ситуации.

Тест-системы различных российских производителей отличаются в рекомендациях по оценке результата. Так, в инструкциях к тест-системам производства ЗАО "Вектор-Бест" (г. Кольцово) "неопределенным" результатом считается изолированное выявление антител лишь к одному из неструктурных белков вируса.

В инструкции к тест-системе "ДС-ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM" производства ООО "НПО "Диагностические системы" (г. Н.Новгород) по-

ложительным считается результат при выявлении антител даже к одному антигену вируса.

На наш взгляд, любой позитивный результат подтверждающего теста требует продолжения работы с пациентом, дообследования для уточнения диагноза, а в ряде случаев динамического наблюдения.

Работы, посвященные данной проблеме в педиатрии, малочисленны. Отсутствуют рекомендации по тактике ведения детей с выявленными изолированными антителами к белкам вируса гепатита С. В связи с вышесказанным, бесспорной является необходимость определения взаимосвязи спектра антител с особенностями течения заболевания и выработки тактики ведения пациентов с различными вариантами серологического профиля.

В Нижегородском детском гепатологическом центре проводится комплексное обследование детей всех возрастов с впервые выявленными серологическими маркерами вирусного гепатита С.

Комплексное обследование ребенка включает:

1. Сбор эпидемиологического анамнеза (наличие внутрисемейных контактов с больными вирусным гепатитом С или наличие в семье больных с заболеваниями печени неуточненной этиологии, отягощенный парентеральный анамнез (наличие в течение жизни гемотрансфузий, оперативных вмешательств, прием внутривенных наркотиков, проведение пирсинга), у подростков наличие половых контактов с инфицированными HCV).

2. Клинико-лабораторное исследование состояния гепатобилиарной системы (определение активности АлАт, показателей билирубинового обмена, функциональных печеночных проб, УЗИ органов брюшной полости и т. д.)

3. Определение анти-HCV в подтверждающем тесте с определением анти-HCVcorIgM и IgG, а также антител класса М и G к неструктурным белкам с определением коэффициента позитивности (КП).

4. Качественная и количественная оценка РНК HCV в ПЦР, генотипирование.

5. Пункционная биопсия печени (в сложных случаях, требующих дифференциальной диагностики).

Нами определены следующие серологические критерии, свидетельствующие о наличии HCV-инфекции:

- полный профиль антител (анти-HCVcor), анти-HCVNs3, анти-HCVNs4, анти-HCVNs5);
- позитивность по анти-HCVcorIgG;
- позитивность по анти-HCVIgM;(core и NS)
- позитивность по антителам к двум неструктурным белкам HCV (при отсутствии анти-HCVcorIgG);
- нарастание количества анти-HCV в динамике (нарастание КП в динамике; появление ранее отсутствующих антител к антигенам вируса).

HCV-инфекция не вызывает сомнения при наличии 3 из 5 серологических критериев. Кроме того, в практической работе при определении антител имеет значение величина КП и повторное выявление анти-HCV в динамике[5].

Учитывая высокую иммуногенность core-антигена HCV, изолированное выявление у больного анти-HCVcore IgG нами рассматривается как проявление инфекции (фаза, активность определяются дополнительно).

В случае изолированного выявления антител лишь к одному из неструктурных белков (анти-HCVNs3 или анти-HCVNs4 или анти-HCVNs5) вопрос о наличии HCV-инфекции у ребенка решался на основании результатов комплексного обследования, а довольно часто лишь в процессе динамического наблюдения.

Под нашим наблюдением находился 41 ребенок, у которого были выявлены антитела к одному белку вируса. Из них у 18 (43,9%) выявлены анти-HCVcore, у 5 (12,2%) (анти-HCVNs3, у 16 (39,0 %) анти-HCVNs4, у 2 (4,9%) анти-HCVNs5. Ни у одного из этих детей РНК не обнаруживалась.

У 17 из 18 детей (94,4%) с выявленными изолированными анти-HCVcore, эти антитела выявлялись в динамике, хотя у некоторых отмечалось снижение КП вплоть до стойкого исчезновения. Анти-HCVNs4 у большинства детей в динамике сохранялись. Анти-HCVNs3 выявлялись значительно реже. Анти-HCVNs5 при повторном исследовании не выявлены ни у одного ребенка.

При получении отрицательного результата подтверждающего теста и отсутствии других проявлений заболевания пациент в дальнейшем диспансерном наблюдении не нуждался.

При получении положительного результата ребенок ставился на диспансерный учет, проводилось динамическое наблюдение, повторное

обследование через 6-12 месяцев. Снятие с учета осуществлялось при получении стойкого отрицательного результата индикации анти-HCV, отсутствии других клинико-лабораторных признаков заболевания.

При постановке диагноза нами учитывался эпидемиологический анамнез, результаты комплексного обследования ребенка.

В практической работе в детском гепатологическом центре г.Н.Новгорода используются следующие диагнозы:

1. Острый вирусный гепатит С;
2. Хронический вирусный гепатит С (низко-репликативный, высокорепликативный);
3. HCV-пастинфекция под вопросом (перенесенный острый вирусный гепатит С с исходом в выздоровление).

Мы считаем, что критериями выздоровления может являться выявление лишь анти-HCVcoreIgG при отсутствии других клинико-лабораторных проявлений заболевания, уменьшение в динамике КП при определении данной группы антител, вплоть до стойкого исчезновения. А также стойкое исчезновение всех антител, которые ранее определялись за исключением антител лишь к одному из неструктурных белков, однако данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Учитывая, что в настоящее время в мировой практике достоверные критерии выздоровления отсутствуют, данная категория наших пациентов продолжает находиться на диспансерном учете с кратностью обследования 1 раз в год.

В данной ситуации окончательное решение вопроса о наличии инфекции принимается в процессе динамического наблюдения.

Таким образом, диагностика HCV-инфекции требует комплексного подхода, оценки данных эпидемиологического анамнеза, а в ряде случаев, динамического наблюдения и обследования пациента.

1. Гепатит С. (Диагностика, эпидемиология, лечение, профилактика) (Российский консенсус), Москва, 26-27 сентября 2000г. // Вирусные гепатиты: Достижения и перспективы. Информ. бюл. -2000. -№3-(10). -С.3-92.

2. Шахгильдян И.В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И.В. Шахгильдян, М. И. Михайлов, Г.Г. Онищенко - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗРФ, -2003. -С.384.

3. Ершова О.Н. Современные проявления эпидемического процесса гепатита С, активность естественных путей передачи и совершенствование профилактики этой инфекции. Автореф. дис. д.м.н. -Москва, 2006. -С.24-25

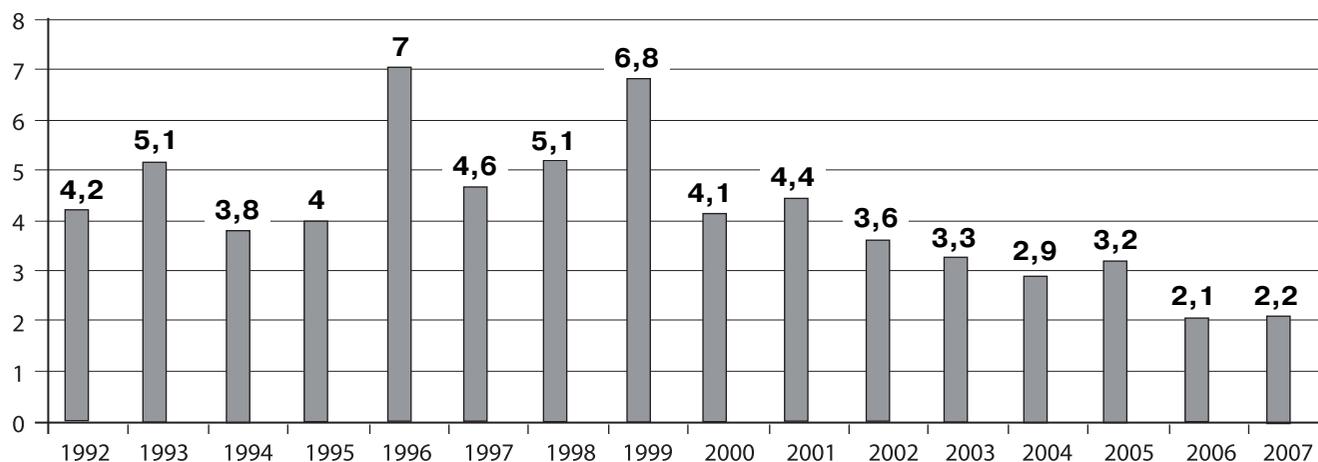
4. Учайкин В.Ф., Чуелов С.Б. Вирусные гепатиты у детей: от прошлого к настоящему // Детские инфекции-2006. -№4-С.4-6.

5. Евлова И.А., Быстрова Т.Н., Ефимов Е.И, Сенягина Н.Е. Сравнительная сероэпидемиологическая характеристика больных с хроническим гепатитом С и лиц с "неопределенным" результатом на антитела к вирусу гепатита С // Труды Всероссийской научной конференции "Теоретические основы эпидемиологии. Современные эпидемиологические и профилактические аспекты инфекционных и массовых неинфекционных заболеваний" Вестник Военно-Медицинской Академии-2008г-приложение 2 (22)-С.434-435.

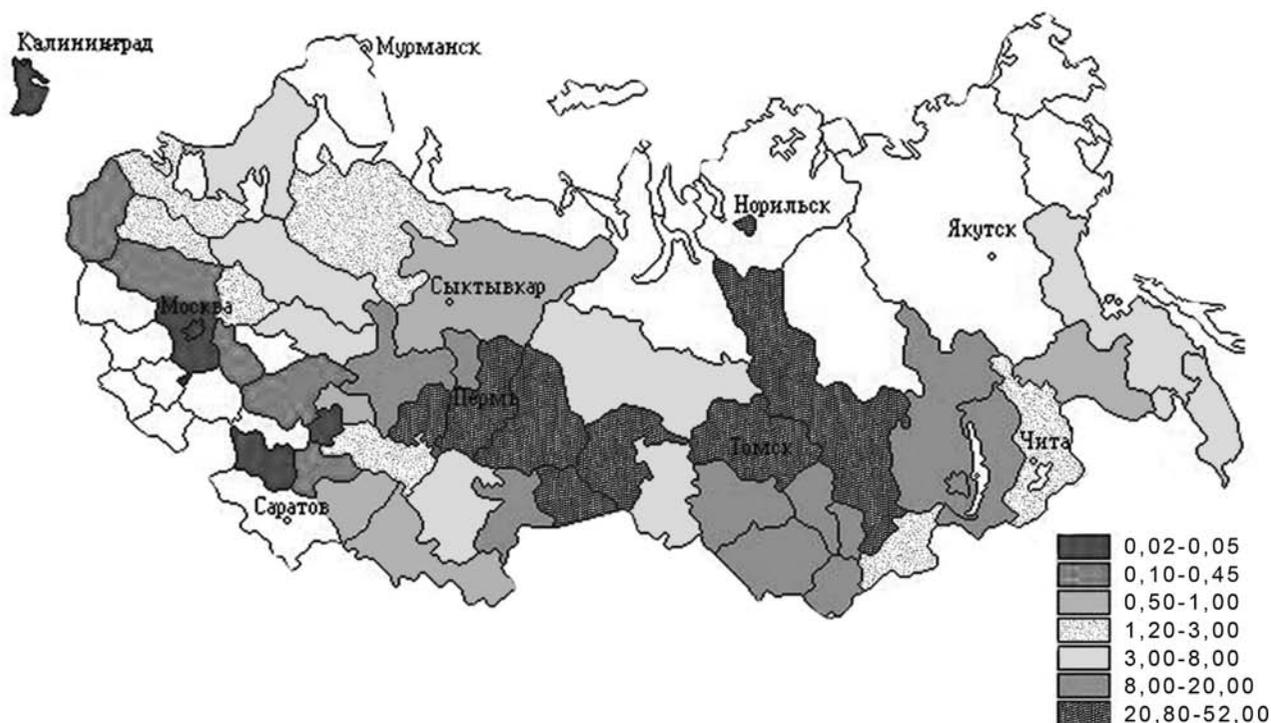
## ЛИТЕРАТУРА

## Общий раздел (социальная информация, статистика, эпидемиология)

**ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ЗА 1992-2007 ГОДЫ (НА 100 ТЫС. НАСЕЛЕНИЯ)\***



**ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ КЛЕЩЕВЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РФ  
(НА 100 ТЫС. НАСЕЛЕНИЯ)\***



\* Использованы материалы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
Федеральный центр гигиены и эпидемиологии

Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях\*  
(за январь—июнь 2008 г., Российская Федерация)

Наименование заболеваний	январь—июнь 2008								январь—июнь 2007				рост, снижение	
	Всего		в том числе у детей в возрасте						Всего		в том числе у детей до 17 лет вкл.		Всего	в том числе у детей до 17 лет вкл.
			до 14 лет вкл.		15-17 лет вкл.		до 17 лет вкл.							
	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.		
Брюшной тиф	28	0,02	2	0,01	1	0,02	3	0,01	41	0,03	10	0,04	-31,4%	-7 сл.
Другие сальмонеллезные инфекции	21707	15,23	10675	50,68	514	8,01	11189	40,72	22894	16,00	11633	40,82	-4,8%	-0,2%
Бактериальная дизентерия (шигеллез)	8446	5,93	4213	20,00	286	4,46	4499	16,37	10197	7,13	5231	18,36	-16,8 %	-10,8%
Острые кишечные инфекции, вызванные установленными бактериальными, вирусными возбудителями, а также пищевые токсикоинфекции установленной этиологии	106800	74,95	87500	415,4	1379	21,50	88879	323,5	94746	66,20	75287	264,2	13,2%	22,4%
Острые кишечные инфекции, вызванные неустановленными инфекционными возбудителями, пищевые токсикоинфекции неустановленной этиологии	239360	168,0	146077	693,5	6935	108,1	153012	556,9	266584	186,3	156884	550,5	-9,8%	1,2%
Энтеровирусные инфекции	678	0,48	412	1,96	24	0,37	436	1,59	1444	1,01	958	3,36	-2,1 раз	-2,1 раз
в том числе энтеровирусный менингит	92	0,06	61	0,29	5	0,08	66	0,24	135	0,09	62	0,22	-31,6%	4 сл.
Острые вирусные гепатиты всего	11336	7,96	2235	10,61	517	8,06	2752	10,02	15153	10,59	3394	11,91	-24,9%	-15,9%
в том числе: острый гепатит А	5270	3,70	2009	9,54	388	6,05	2397	8,72	7285	5,09	2861	10,04	-27,3%	-13,1%
острый гепатит В	3125	2,19	29	0,14	39	0,61	68	0,25	3962	2,77	131	0,46	-20,8%	-46,2%
острый гепатит С	2147	1,51	49	0,23	57	0,89	106	0,39	2813	1,97	139	0,49	-23,3%	-20,9%
Острый паралитический полиомиелит	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	-1 сл.	-1 сл.
ассоциированный с вакциной	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	1	0,00	-1 сл.	-1 сл.
Острые вялые параличи	90	0,06	90	0,43	0	0,00	90	0,33	158	0,11	158	0,55	-42,8%	-40,9%
Дифтерия	35	0,02	6	0,03	1	0,02	7	0,03	56	0,04	23	0,08	-37,2%	-3,2 раз
Коклюш	1733	1,22	1608	7,63	66	1,03	1674	6,09	5035	3,52	4922	17,27	-2,9 раз	-2,8 раз
Корь	20	0,01	3	0,01	2	0,03	5	0,02	139	0,10	29	0,10	-6,9 раз	-5,6 раз
Краснуха	7898	5,54	4522	21,47	959	14,95	5481	19,95	25129	17,56	20271	71,14	-3,2 раз	-3,6 раз
Паротит эпидемический	1015	0,71	430	2,04	70	1,09	500	1,82	1085	0,76	780	2,74	-6,0%	-33,5%
Менингококковая инфекция	1311	0,92	844	4,01	40	0,62	884	3,22	1576	1,10	1113	3,91	-16,4%	-17,6%
в том числе генерализованные формы	1151	0,81	774	3,67	32	0,50	806	2,93	1281	0,90	948	3,33	-9,8%	-11,8%

Наименование заболеваний	январь—июнь 2008								январь—июнь 2007				рост, снижение	
	Всего		в том числе у детей в возрасте						Всего		в том числе у детей до 17 лет вкл.		Всего	в том числе у детей до 17 лет вкл.
			до 14 лет вкл.		15-17 лет вкл.		до 17 лет вкл.							
	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.	абс. число	на 100 тыс. нас.		
Гнойно-септические инфекции новорожденных	3104	-	3104	-	0	-	3104	-	3187	-	3187	-	-2,6%	-2,6%
Туляремия	20	0,01	4	0,02	0	0,00	4	0,01	21	0,01	3	0,01	-1 сл,	1 сл,
Сибирская язва	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	-1 сл,	-
Бруцеллез, впервые выявленный	177	0,12	13	0,06	3	0,05	16	0,06	135	0,09	7	0,02	31,7%	9 сл,
Геморрагические лихорадки	1863	1,31	36	0,17	40	0,62	76	0,28	2148	1,50	139	0,49	-12,9%	-43,3%
в том числе с почечным синдромом	1741	1,22	32	0,15	40	0,62	72	0,26	1974	1,38	134	0,47	-11,4%	-44,3%
Клещевой весенне-летний энцефалит	820	0,58	106	0,50	25	0,39	131	0,48	1039	0,73	173	0,61	-20,7%	-21,5%
Клещевой боррелиоз (болезнь Лайма)	2497	1,75	247	1,17	30	0,47	277	1,01	2386	1,67	262	0,92	5,1%	9,6%
Псевдотуберкулез	2400	1,68	1739	8,26	145	2,26	1884	6,86	2915	2,04	2250	7,90	-17,3%	-13,2%
Лептоспироз	101	0,07	1	0,00	1	0,02	2	0,01	132	0,09	8	0,03	-23,1%	-6 сл,
Бешенство	6	0,00	0	0,00	1	0,02	1	0,00	1	0,00	0	0,00	5 сл,	1 сл,
Риккетсиозы	1219	0,86	302	1,43	39	0,61	341	1,24	1281	0,90	369	1,29	-4,4%	-4,2%
в том числе: эпидемический сыпной тиф	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	-	-
болезнь Брилла	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	1 сл,	-
лихорадка Ку	8	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00	74	0,05	3	0,01	-9,2 раз	-3 сл,
Педикулез	144405	101,3	36532	173,4	4269	66,56	40801	148,5	137753	96,25	30726	107,8	5,3%	37,7%
Туберкулез (впервые выявленный) активные формы	52659	36,96	1439	6,83	914	14,25	2353	8,56	50929	35,59	2576	9,04	3,9%	-5,3%
в том числе туберкулез органов дыхания	50831	35,67	1206	5,73	877	13,67	2083	7,58	48899	34,17	2305	8,09	4,4%	-6,3%
из них бациллярные формы	19890	13,96	49	0,23	152	2,37	201	0,73	19161	13,39	254	0,89	4,3%	-17,9%
Сифилис (впервые выявленный) все формы	42177	29,60	347	1,65	1063	16,57	1410	5,13	42805	29,91	1511	5,30	-1,0%	-3,2%
Гонорея (острая и хроническая)	38949	27,34	141	0,67	1194	18,62	1335	4,86	38815	27,12	1389	4,87	0,8%	-0,3%
Болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека	6026	4,23	134	0,64	35	0,55	169	0,62	5044	3,52	179	0,63	20,0%	-2,1%
Бессимптомный инфекционный статус, вызванный ВИЧ)	15858	11,13	190	0,90	129	2,01	319	1,16	13673	9,55	307	1,08	16,5%	7,8%
Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной или неуточненной локализации	15782981	11076,8	910650	43207,6	1072389	16719,2	10173039	37024,2	15902938	11112,1	10645656	37357,8	-0,3%	-0,9%
Грипп	317319	222,7	105428	500,5	17485	272,6	122913	447,3	497170	347,4	263885	926,0	-35,9%	-2,1 раз
Малярия впервые выявленная	46	0,03	7	0,03	0	0,00	7	0,03	51	0,04	1	0,00	-5 сл,	6 сл,
Трихинеллез	110	0,08	11	0,05	6	0,09	17	0,06	76	0,05	21	0,07	45,4%	-4 сл,
Поствакцинальные осложнения	259	0,18	232	1,10	0	0,00	232	0,84	239	0,17	205	0,72	8,8%	17,4%

\* Используются материалы ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора/ <http://www.fcgsen.ru>

## Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний

## Инфекции ToRCH - комплекса

## Токсоплазмоз

**1/390 Неонатальный скрининг на наличие специфических IgM к *T. gondii* методом сухой капли крови в Познаньском регионе Польши.**

Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in the Poznan region of Poland by analysis of *Toxoplasma gondii*-specific IgM antibodies eluted from filter paper blood spots.

M. Paul, E. Petersen, Z.S. Pawlowski, J. Szczapa  
Pediatr Infect Dis J., 2000; 19(1):30-36

PMID: 10643847

**Цель исследования.** Изучить распространенность врожденного токсоплазмоза в Познаньском регионе (Польша), определить значение метода сухой капли крови (СКК) в диагностике врожденной токсоплазменной инфекции, а также частоту и сроки циркуляции специфических IgM к *T. gondii* в сыворотке крови новорожденных.

**Методы.** В исследование были включены все новорожденные, родившиеся в университетской клинике акушерства и гинекологии (г. Познань) и в 10 акушерских стационарах региона. Образцы крови новорожденных для исследования методом СКК были получены в период с первого по шестой день жизни; серологический скрининг на специфические IgM к *T. gondii* проводили при помощи иммуноферментного анализа, а в случае положительного результата определяли IgG и IgA.

**Результаты.** В период с июня 1996г. по октябрь 1998г. методом СКК были исследованы образцы крови 27516 новорожденных, рожденных живыми (что составило около 75% от общего количества родившихся детей и 83% от количества детей родившихся живыми, в Познаньском регионе). Специфические IgM были обнаружены у 13 детей, что соответствовало распространенности IgM к *T. gondii* среди новорожденных - 1 случай на 2117 живорожденных детей (0,47 на 1000) или 1 случай на 870 детей (1,15 на 1000), рожденных серонегативными матерями, имеющими риск первичного инфицирования *T. gondii* во время беременности. В ходе исследования врожденная инфекция была диагностирована у двух детей, IgM-негативных при рождении, имеющих классическую триаду клинических симптомов в первый год жизни и высокие уровни специфических IgG. Распространенность врожденного токсоплазмоза в Познаньском регионе составила - 1 случай на 1834 живорожденного ребенка (0,55 на 1000) или 1 случай на 754 ребенка (1,33 на 1000), рожденных серонегативными матерями. Чувствительность метода СКК при выявлении IgM составила 86,7%, а средняя продолжительность циркуляции IgM, определяемых иммуноферментным методом, составила в среднем 4,8 недели с момента рождения.

**Выводы.** Распространенность врожденного токсоплазмоза в Польше, установленная в ходе скринингового исследования, составила 1 случай на 2000 живорож-

денных детей. В связи с этим представляется целесообразным рассмотрение вопроса о включении серологического скрининга на врожденный токсоплазмоз в национальную программу, наряду с неонатальным скринингом на фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз.

**2/391 Связь между пренатальным лечением и клиническими проявлениями врожденного токсоплазмоза у новорожденных: когортное исследование в 13 европейских центрах.**

Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres.

L. Gras, M. Wallon, A. Pollak, M. Cortina-Borja, B. Evengard, M. Hayde, E. Petersen, R. Gilbert  
Acta Paediatr., 2005;94(12):1721-1731

PMID: 16421031

**Цель исследования.** Определить влияние пренатального (дородового) лечения на клинические проявления врожденного токсоплазмоза.

**Методы.** В процессе пренатального и неонатального скрининга у 255 живорожденных младенцев был диагностирован врожденный токсоплазмоз. Проводили пренатальное лечение для снижения риска поражений головного мозга и глаз у младенцев; рассчитывали гестационный возраст ребенка при сероконверсии у матери.

**Результаты.** Пренатальное лечение в течение первых 4 недель после сероконверсии приводит к уменьшению риска поражений головного мозга у новорожденных, по сравнению с контрольной группой, не получавшей пренатальное лечение (ОР- 0,28; 95% ДИ: 0,08-0,75); однако при сравнении контрольной группы с группой, получавшей лечение позднее 4 недель после сероконверсии, статистически значимой разницы не выявлено (ОР-0,76; 95%ДИ: 0,35-1,59; p=0,19). В группе, получавшей лечение спирамицином, отмечено уменьшение риска поражений головного мозга в два раза по сравнению с группой, не получавшей лечения (ОР-2,33; 95% ДИ: 1,04-5,50); но по сравнению с группой, получавшей лечение пириметамин - сульфонамидом, статистически значимых различий не обнаружено (p=0,52). Взаимосвязи между типом или сроком начала лечения и риском поражения глаз не выявлено. Гестационный возраст ребенка к моменту сероконверсии у матери был обратно пропорционален риску поражений головного мозга, однако взаимосвязи его с риском поражения глаз не выявлено.

**Выводы.** Только раннее начало пренатального лечения достоверно связано со сниженным риском поражений головного мозга у детей. Для подтверждения полученных результатов необходимо провести большое рандомизированное контролируемое клиническое исследование и/или мета-анализ индивидуальных данных.

### 3/392 Токсоплазмоз и беременность. Мультицентровое исследование с участием 16362 беременных женщин в Барселоне.

Toxoplasmosis and pregnancy. Multicenter study of 16,362 pregnant women in Barcelona.

C. Munoz Batet, C. Guardia Llobet, T. Juncosa Morros, L. Vinas Domenech, M. Sierra Soler, I. Sanfeliu Sala, J. Bosch Mestres, E. Dopico Ponte, J. Lite Lite, L. Matas Andreu, C. Juste Sanchez, M. Barranco Romeu Med Clin (Barc.), 2004 5;123(1):12-16  
PMID: 15207221

**Цель исследования.** Изучить: 1) распространенность антител к *T. gondii* у беременных женщин, 2) частоту первичного инфицирования в период беременности и 3) распространенность врожденного токсоплазмоза.

**Методы.** Распространенность антител к *T. gondii* была ретроспективно проанализирована у 16362 беременных женщин, посещавших 8 больниц и 2 дневных стационара в Барселоне в течение 1999 года. Каждая участвующая лаборатория использовала собственные тесты для определения IgM, IgA, IgG к *T. gondii* и avidности IgG. В случае положительного результата на IgM, был затребован второй образец сыворотки крови, который исследовали параллельно с первым. Были выявлены три стадии инфекции: перенесенная (латентная), вероятная (подозрение на токсоплазмоз) и острая. Врожденную инфекцию диагностировали пренатально при ПЦР - исследовании амниотической жидкости или постнатально при исследовании сыворотки крови новорожденного.

**Результаты.** Распространенность антител к *T. gondii* среди беременных составила 28,6%. Частота первичного инфицирования в период беременности составила 1,02 на 1000 беременных. У 9 из 12 женщин с острой токсоплазменной инфекцией в период беременности была выявлена сероконверсия; у 5 из них родились дети с врожденным токсоплазмозом (вертикальная передача - 41,6%). У четверых детей, родившихся живыми, симптомы заболевания не обнаружены как при рождении, так и в дальнейшем.

**Выводы.** В данном исследовании выявлена низкая распространенность токсоплазмоза. Острый токсоплазмоз диагностирован, в основном, по наличию сероконверсии у беременных. Вертикальная передача инфекции зарегистрирована в половине случаев.

### 4/393 Септический шок, обусловленный врожденным диссеминированным токсоплазмозом?

Septic shock due to congenital disseminated toxoplasmosis?

F. Cneude, R. Deliege, C. Barbier, I. Durand-Joly, A. Bourlet, M. Sonna, R. El. Kohen, A. Locquet, G. Vittu, A. Decoster  
Arch Pediatr., 2003;10(4):326-328  
PMID: 12818753

Врожденный токсоплазмоз, являясь вторичным по отношению к первичной инфекции у матерей (в случае инфицирования на поздних сроках беременности), обычно протекает бессимптомно. В данной статье сообщается о новорожденном, чья мать была инфицирована на сроке беременности между 27 и 33 недель. Мать во время беременности никакого лечения не получала. У новорожденного диагностирована диссеминированная форма токсо-

плазмоза, сопровождающаяся гепатоспленомегалией, пневмонией, пурпурой и гепатитом. На третий день жизни у новорожденного развился септический шок. Несмотря на проводимое лечение, ребенок умер. Септический шок при диссеминированном токсоплазмозе - проявление необычное, хотя и описано у пациентов с иммунодефицитом, особенно у ВИЧ-инфицированных.

### 5/394 Факторы риска инфекции *Toxoplasma gondii* у матерей детей с врожденным токсоплазмозом: тактика ведения беременных и пренатальный скрининг.

Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening.

K.M. Boyer, E. Holfels, N. Roizen, C. Swisher, D. Mack, J. Remington, S. Withers, P. Meier, R. McLeod  
Am J Obstet Gynecol., 2005; 192(2):564-571  
PMID: 15696004

**Цель исследования.** Установить позволяют ли определенные факторы (демографические характеристики, наличие в анамнезе контакта с больным или заболевания похожего на токсоплазмоз) выявлять женщин с риском рождения детей с врожденным токсоплазмозом.

**Дизайн исследования.** В исследовании приняли участие матери детей (n=131), включенных в национальную программу лечения врожденного токсоплазмоза. Проводили анализ демографических признаков, и данных опроса матерей для выявления источника заражения, факторов риска инфицирования или случаев заболевания в анамнезе.

**Результаты.** Ни один из известных демографических признаков не удалось связать с факторами риска в популяции. Только 48% опрошенных матерей указали на эпидемиологические факторы риска (употребление в пищу сырого/недостаточно термически обработанного мяса, контакт с кошачьими экскрементами) или на заболевания в период беременности с симптоматикой, аналогичной при остром токсоплазмозе.

**Выводы.** В ходе ретроспективного исследования в Северной Америке было выяснено, что только 48% матерей связывали факторы риска инфицирования *T. gondii* (или наличие в анамнезе заболевания со сходными симптомами) с врожденным токсоплазмозом у их детей. Специальные образовательные программы, возможно, могли бы предотвратить заражение *T. gondii* тех матерей, у которых выявлены факторы риска. Однако только систематический серологический скрининг всех беременных женщин до родов или всех новорожденных при рождении сможет предотвратить или выявить более высокий процент этой врожденной инфекции.

### 6/395 Связь между врожденным токсоплазмозом, преждевременными родами, низким весом новорожденных и малым гестационным возрастом при рождении.

Association between congenital toxoplasmosis and preterm birth, low birthweight and small for gestational age birth.

K. Freeman, L. Oakley, A. Pollak, W. Buffolano, E. Petersen, A.E. Semprini, A. Salt, R. Gilbert  
BJOG., 2005;112(1):31-37  
PMID: 15663394

**Цель исследования.** Определить связь между врожденным токсоплазмозом, преждевременными родами, низким весом и малым гестационным возрастом детей.

Проведено проспективное многоцентровое когортное исследование. Пренатальный скрининг на токсоплазмоз осуществляли 10 европейских центров.

В исследование были включены 386 первобеременных женщин, у которых на сроке беременности до 20 недель выявлена сероконверсия к *T. gondii* (роды у них произошли после 23 недели беременности); и 234 женщины с сероконверсией, выявленной на 20 неделе беременности или позднее; положительные результаты серологического исследования у которых регистрировались до 37 недели беременности (роды произошли после 36 недели беременности).

**Методы.** В исследовании проводили сравнение инфицированных и неинфицированных новорожденных. Основными критериями явились: гестационный возраст и вес при рождении и центильная оценка этих показателей.

**Результаты.** Выявлено, что в случае инфицирования роды происходили раньше, средняя разница во времени рождения составила - 5,4 дней (95%ДИ: -1,4; -9,4) при сероконверсии, выявленной на сроке беременности до 20 недель, а на сроке 20 недель и позднее - 2,6 дней (95%ДИ: -0,5; -4,7). Врожденная инфекция была связана с повышенным риском невынашивания беременности (преждевременных родов) в случаях сероконверсии на сроках до 20 недель беременности (ОР 4,71; 95%ДИ: -2,03; -10,9). Существенных различий при оценке веса новорожденных при рождении (в том числе по центильным шкалам) не обнаружено.

**Вывод.** Дети с врожденным токсоплазмозом родились раньше, чем неинфицированные, однако точные механизмы, приведшие к преждевременным родам неизвестны.

Врожденная инфекция может вызывать преждевременные роды или являться показанием к оперативному родоразрешению путем кесарева сечения. В настоящем исследовании не обнаружено значимой связи между врожденным токсоплазмозом, низким весом или малым гестационным возрастом при рождении.

## Цитомегаловирусная инфекция

### 7/396 Клиническая значимость прямого определения pp65-антигемии при помощи проточной цитометрии у реципиентов со лидных органов и стволовых клеток.

Clinical relevance of direct quantification of pp65 antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients.

A.S. Poirier-Toulemonde, N. Milpied, D. Cantarovich, J.F. Morcet, S. Billaudel, B.M. Imbert-Marcille  
J Clin Microbiol., 2000; 38(9):3143-3149  
PMID: 10970347

В общей сложности проспективно было исследовано 1305 образцов крови от 85 реципиентов со лидных органов и 25 реципиентов стволовых клеток с риском ЦМВ-инфекции с использованием метода однослойной культуры клеток (МОКК) и определением ЦМВ в лейкоцитах с помощью качественной ПЦР (к-ПЦР, q-PCR). Из них в 462 образцах крови в дальнейшем проводили количественное определение ЦМВ-антигемии с помощью проточной ци-

тометрии (ПЦ-Аг), 125 образцов исследовали при помощи конкурентной к-ПЦР, 200 образцов исследовали на pp65-антигемии. Проводили статистический анализ лабораторных данных в соответствии с клиническими проявлениями ЦМВИ. У реципиентов со лидных органов и стволовых клеток активная ЦМВИ выявлена в 63,5 и 36% случаев, соответственно. Органные поражения, вызванные ЦМВ, отмечались в 53 и 24% случаев, соответственно. Результаты ПЦ-Аг лучше коррелировали с данными к-ПЦР (q-PCR) и результатами определения pp65, чем с МОКК. Первые положительные результаты исследования были зафиксированы с помощью теста ПЦ-Аг (73% случаев). У реципиентов со лидных органов тест ПЦ-Аг показал наибольшую чувствительность и ОПЗ при диагностике ЦМВ-патологии любой степени выраженности. ПЦ-Аг-тест может быть ценным для раннего выявления ЦМВИ и прогноза заболеваний, вызываемых ЦМВ.

### 8/397 Затруднения при диагностике перфорации желудка, ассоциированной с ЦМВ, у ВИЧ-инфицированных.

Difficulties in assessing cytomegalovirus-associated gastric perforation in an HIV-infected patient.

B. Megarbane, D. Resiere, J. Ferrand, L. Raskine, K. Vahedi, F.J. Baud  
BMC Infect Dis., 2005 13; 5(1):28  
PMID: 15829006

Активная цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) является частым осложнением поздней стадии ВИЧ-инфекции. ЦМВ-индуцированная интестинальная перфорация сложна для диагностики и может встречаться на всем протяжении желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Изолированная перфорация желудка встречается редко.

#### Случай из практики.

В отделение интенсивной терапии поступил 47-летний мужчина с синдромом полиорганной недостаточности. При эндоскопическом исследовании ЖКТ выявлен эритематозный гастрит; двенадцатиперстная кишка и толстый кишечник без патологии. При исследовании культуральным методом выделен ЦМВ. При гистологическом исследовании биоптата слизистой желудка выявлен воспалительный инфильтрат, а также типичный гистологический признак ЦМВИ - внутриядерные включения. При компьютерной томографии (КТ) органов брюшной полости обнаружены обширные очаги пониженной плотности в перипанкреатической области без признаков пневмоперитонеума (скопления воздуха, газа в брюшной полости). Больной умер, несмотря на поддерживающую терапию и внутривенные инфузии ганцикловира. На вскрытии обнаружена перфорация стенки желудка диаметром 4 см с пенетрацией в поперечную ободочную кишку и печень, очаги некроза в поджелудочной железе. В других участках ЖКТ патологии не выявлено. В связи с тем, что другие возможные причины (в первую очередь инфекция *Helicobacter pylori*) были исключены, было отмечено, что ЦМВ является вероятной причиной развития патологии желудочно-кишечного тракта.

**Выводы.** ЦМВИ может обуславливать перфорацию желудка, что зачастую очень трудно диагностировать. Ранняя диагностика, основанная на данных эндоскопии и гистопатологических исследований, необходима для достижения благоприятных результатов.

**9/398 Связь диабета 2 типа с распространенностью антител к ЦМВ.**

Association of type 2 diabetes mellitus and seroprevalence for cytomegalovirus.

B.W. Roberts, I. Cech

South Med J., 2005; 98(7):686-692

PMID: 16108236

Инфекции играют определенную роль в этиологии сахарного диабета 1 типа, однако данных об их роли в развитии сахарного диабета 2 типа известно недостаточно.

**Цель исследования.** Изучить распространенность антител к отдельным вирусам в группе испаноязычных пациентов с сахарным диабетом 2 типа и в контрольной группе пациентов без диабета.

**Методы.** Сто тринадцать пациентов (83 пациента с сахарным диабетом 2 типа и 30 пациентов группы контроля), находившихся на гемодиализе в одной из клиник Сан-Антонио (шт. Техас, США), были обследованы на наличие антител к вирусу Коксаки В, цитомегаловирусу (ЦМВ) и парвовирусу. Шестьдесят шесть пациентов с сахарным диабетом 2 типа и 25 пациентов группы контроля, были

обследованы 2 раза в месяц на протяжении 6 месяцев.

**Результаты.** В ходе исследования выявлен более высокий уровень IgG к ЦМВ среди пациентов с сахарным диабетом (97,6%), чем в группе контроля (86,7%), эта разница была статистически значима (ОР = 6,2, 95%ДИ: 1,1 до 36,0,  $p < 0,05$ ). Трое из 91 пациента были исключены из исследования из-за большого расхождения результатов (ОР = 12,4, 95%ДИ: 1,3 до 117,  $p < 0,05$ ). Среди пациентов с сахарным диабетом выявлено значительно больше ( $p < \text{или} = 0,001$ ) сосудистых осложнений. Была установлена взаимосвязь между сахарным диабетом, повышенным уровнем антител к ЦМВ и возрастом.

**Выводы.** В настоящем исследовании выявлена в 12 раз большая вероятность развития сахарного диабета 2 типа у лиц, ранее инфицированных ЦМВ. Так как прогрессирующий атеросклероз также связан с сахарным диабетом и ЦМВ, то хроническая или латентная ЦМВИ может быть общим фактором риска развития атеросклероза и сахарного диабета. Авторы исследования не обнаружили связи между сахарным диабетом 2 типа и другими вирусами (Коксаки В или парвовирусом).

**ВНИМАНИЕ НОВИНКИ!****Контрольная панель сывороток, содержащих и не содержащих анти-ВЭБ-NA-G.**

Предназначена для оценки качества лабораторных исследований на антитела класса G к ядерному антигену вируса Эпштейна-Барр.

**Комплект включает:** 10 флаконов с лиофильно высушенными образцами сывороток (4 положительных и 6 отрицательных), инструкцию по применению.

**Срок годности**—24 месяца.  
**Каталожный номер**—H-1031

**Контрольная панель сывороток, содержащих и не содержащих анти-ВЭБ-VCA-G.**

Предназначена для оценки качества лабораторных исследований на антитела класса G к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр.

**Комплект включает:** 7 флаконов с лиофильно высушенными образцами сывороток (5 положительных и 2 отрицательных), инструкцию по применению.

**Срок годности**—24 месяца.  
**Каталожный номер**—H-1131

**Контрольная панель сывороток, содержащих и не содержащих анти-ВЭБ-EA-G.**

Предназначена для оценки качества лабораторных исследований на антитела класса G к раннему антигену вируса Эпштейна-Барр.

**Комплект включает:** 8 флаконов с лиофильно высушенными образцами сывороток (4 положительных и 4 отрицательных), инструкцию по применению.

**Срок годности**—24 месяца.  
**Каталожный номер**—H-1231

**Контрольная панель сывороток, содержащих и не содержащих анти-ЦМВ-G.**

Предназначена для оценки качества лабораторных исследований на антитела класса G к цитомегаловирусу.

**Комплект включает:** 14 флаконов с лиофильно высушенными образцами сывороток (10 положительных и 4 отрицательных), инструкцию по применению.

**Срок годности**—24 месяца.  
**Каталожный номер**—CM-331

## Сифилис

### 10/399 Использование Вестерн-блота, содержащего пять рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*, для серологической диагностики сифилиса.

Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis.

V. Sambri, A. Marangoni, C. Eyer, C. Reichhuber, E. Soutschek, M. Negosanti, A. D'Antuono, R. Cevenini

Clin Diagn Lab Immunol., 2001; 8(3):534-539  
PMID: 11329453

На нитроцеллюлозную мембрану были нанесены пять иммунодоминантных полипептидов *T. pallidum* (rTpN47, rTmрA, rTpN37, rTpN17 и rTpN15), полученных методом рекомбинантного синтеза. Для оценки диагностической значимости рекомбинантного Вестерн-блота (recWB) в сравнении с иммуноблотом на основе цельноклеточного экстракта (wciWB) и гемагглютинационным тестом (МНА-ТР) при лабораторной диагностике сифилиса были проанализированы 450 образцов сывороток крови (200 - от доноров крови, 200 - от больных сифилисом и 50 - потенциально перекрестно-реактивных образцов). Ни один из образцов сывороток крови доноров или потенциальных кросс-реактивных образцов не дал положительных результатов при исследовании методами recWB, wciWB или МНА-ТР. При помощи recWB исследовали сыворотки крови пациентов с различными стадиями сифилиса. Анализ результатов показал, что IgG чаще определялись к антигену rTmрA (95%), тогда как антитела к антигену rTpN37 выявлены только в 41% образцов. Частота выявления антител к другим рекомбинантным белкам составила: к rTpN47 - 92,5%; к rTpN17 - 89,5%; к rTpN15 - 67,5%. Совпадение результатов recWB и МНА-ТР в среднем составило 95,0% (100% при исследовании сывороток крови больных сифилисом в скрытой форме и на поздней стадии), совпадение результатов wciWB и МНА-ТР составило 92%. Совпадение результатов recWB и wciWB составило в среднем 97,5% (100% при исследовании сывороток крови больных вторичным и поздним сифилисом; при исследовании сывороток больных первичным и скрытым сифилисом, совпадение составило 94,6% и 98,6% соответственно). В целом, чувствительность recWB составила 98,8%, специфичность - 97,1% при использовании МНА-ТР в качестве референс-метода. Показатели чувствительности и специфичности несколько превысили расчетные показатели для wciWB (чувствительность - 97,1%, специфичность - 96,1%). При использовании wciWB в качестве референс-теста чувствительность и специфичность для recWB составили 98,9% и 99,3%, соответственно. Полученные данные позволяют предположить, что пять рекомбинантных полипептидов, использованных в данном исследовании, могли бы применяться для замены лизатных антигенов *T. pallidum*. Разработанный тест recWB является функциональным, простым в использовании тестом для определения и подтверждения специфических антител к *T. pallidum* в сыворотке крови.

### 11/400 Папиллит (воспаление диска зрительного нерва) как проявление первичного сифилиса.

A case of papillitis revealing primary syphilis.

S. B'chir Hamzaoui, Z. Znagui, H. Farah, K. Bouslama, M. Ben Dridi

Med Mal Infect., 2007; 37(1):67-68  
PMID: 17196351

**Цель исследования.** Сифилис глаз отличается полиморфными проявлениями, обычно возникающими на вторичной или третичной стадиях сифилиса. В настоящей статье описан случай папиллита при первичном сифилисе.

**Дизайн исследования.** 22-летний мужчина обратился с жалобами на нечеткое, "размытое" видение левым глазом и снижение остроты зрения. Обследование глазного дна при помощи флюоресцентной ангиографии позволило выявить отек диска зрительного нерва левого глаза и хориоретинит правого. При клиническом обследовании обнаружено безболезненное изъязвление подбородка. Анализы крови оказались положительными на сифилис (положительный VDRL-тест и титр РПГА 1/640), но отрицательными на ВИЧ. После лечения пенициллином глазные симптомы исчезли.

**Результаты.** Папиллит является довольно редким проявлением сифилиса. Описанный случай интересен тем, что папиллит оказался проявлением первичного сифилиса наряду с твердым шанкром.

**Выводы.** В случаях выявления воспалительных заболеваний глаз неясной этиологии необходимо проводить систематический скрининг на сифилис.

### 12/401 Сифилис у ВИЧ-инфицированных пациентов. Обзор.

Managing syphilis in the HIV-infected patient.

C.S. Hall, J.D. Klausner, G.A. Bolan  
Curr Infect Dis Rep., 2004; 6(1):72-81  
PMID: 14733852

#### Резюме

В последние годы проблема сифилиса вновь возникла не только в США, но и в других странах. Врачи, занимающиеся лечением ВИЧ-инфицированных, должны хорошо разбираться и в вопросах современной диагностики и лечения сифилиса. ВИЧ изменяет естественное течение сифилиса, поэтому у пациентов с коинфекцией сифилиса и ВИЧ первоначальные клинические проявления сифилитической инфекции могут быть разнообразными. Хотя существуют общепринятые критерии интерпретации результатов рутинных серологических тестов на сифилис, методы выявления антител не могут быть идеальным индикатором активной инфекции. Крайне важным в диагностике сифилиса у пациентов с данной коинфекцией является выявление всех возможных симптомов инфекции и факторов рискованного сексуального поведения. Лечение сифилиса у таких пациентов требует подбора терапии в зависимости от стадии инфекции с обязательным серологическим мониторингом. Клиницисты должны уделять особое внимание оценке рисков, серологическому скринингу, распознаванию симптомов заболевания и диспансерному наблюдению пациентов. Крайне важно также уделять внимание аспектам, направленным на сохранение и укрепле-

ние общественного здоровья, в том числе вопросам лечения половых партнеров и организации строгого медико-статистического учета.

## Введение

Сэр Уильям Ослер однажды сказал: "Тот, кто знает сифилис - знает медицину". Удачно описанная как "великий имитатор", *Treponema pallidum* избежала уничтожения в новом тысячелетии. В настоящее время коинфекция *T. pallidum* и ВИЧ представляет серьезную проблему для здравоохранения во всем мире. В данной статье рассматриваются вопросы лечения сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов и современные подходы к клинической диагностике.

## Эпидемиология коинфекции ВИЧ и *Treponema pallidum*

Взаимосвязь между генитальными язвенными заболеваниями, включая сифилис, и риском ВИЧ-инфекции хорошо известна (Fleming DT, 1999; Greenblatt RM, 1988; Darrow WW, 1987; Stamm WE, 1988). При наличии сифилиса риск заражения ВИЧ-инфекцией повышается в 2-9 раз, уровень заболеваемости - в 2-4 раза (Fleming DT, 1999). Это связано с поведенческими факторами риска и патогенетическими механизмами, в том числе с упрощением трансмиссии ВИЧ в случае появления ассоциированного с сифилисом изъязвления и воспаления (Stamm WE, 1988).

## Окончание эры: недавний "всплеск" заболеваемости сифилисом

Несмотря на значительное снижение числа случаев сифилиса в США в последнее десятилетие, а также декларацию, выдвинутую Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США), об элиминации сифилиса в США к 2005 году, заболеваемость стала увеличиваться с 2000 года, особенно среди гомосексуалистов (CDC, 1999-2002). В 2002 году были зарегистрированы 6862 случая первичного и вторичного сифилиса, что на 12,4% больше по сравнению с показателем предыдущего года и минимальным показателем предыдущего десятилетия (5979 случаев в 2000г.; CDC, 2002). Например, в Калифорнии в первой половине 2003г. зарегистрировано 670 случаев первичного и вторичного сифилиса, то есть 4-х кратное увеличение по сравнению с показателем за аналогичный период 1999 года; из общего числа инфицированных 79% составили гомосексуалисты, из которых 60% оказались ВИЧ-позитивными, большинство (59%) вступали в случайные половые контакты.

Подъем заболеваемости был связан с увеличением числа случайных половых связей, с отказом от использования презервативов, использованием Интернета для поиска партнеров, а также с увеличением употребления таких наркотиков, как метамфетамин и силденафил (Ciesielsky SA, 2003; Golden MR, 2003; Lo TQ, 2003). Кроме того, описано косвенное содействие высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) передаче сифилиса среди ВИЧ-инфицированных пациентов (Katz MH, 2002) (применение ВААРТ снижает вирусную нагрузку, сокращает число и тяжесть осложнений, благодаря ВААРТ ВИЧ-инфицирован-

ные чувствуют себя лучше, ведут активный образ жизни и живут дольше).

## Выявление сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов

Выявление ИППП у ВИЧ-инфицированных пациентов должно явиться основанием для изучения собственных поведенческих факторов риска в целях предотвращения возможного инфицирования других (Klausner JD, 2003). Оценка сексуального здоровья должна стать частью программы наблюдения (ведения) пациентов с ВИЧ. Для пациентов, имеющих множество сексуальных партнеров или партнера, живущего беспорядочной половой жизнью с частой сменой партнеров, скрининг на ИППП (сифилис, гонорею и хламидиоз), должен производиться ежегодно. На сегодняшний день эксперты также рекомендуют проведение скрининга 1 раз в 3-6 месяцев у пациентов из групп риска по сифилису. К факторам риска относят: случайные половые контакты с множественными партнерами, совместное употребление наркотиков, коммерческий секс, подбор сексуальных партнеров на Интернет-сайтах (LoTQ, 2003; Winston A, 2003;). Поскольку антитела к *T. pallidum* не являются протективными, при рискованном сексуальном поведении возможна реинфекция.

## Клиническая картина сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Сифилитическая инфекция известна многообразием клинических проявлений, отражающих диссеминацию *T. pallidum* по организму. Кроме поражений кожи, слизистых оболочек и системных проявлений на первичной стадии и вторичной стадиях заболевания, в более поздние сроки в патологический процесс могут вовлекаться другие органы и системы: опорно-двигательный аппарат, внутренние органы, нервная и эндокринная системы, органы чувств.

## Характеристика проявлений сифилиса на разных стадиях

Общепринятое деление сифилиса на стадии сохраняется и при коинфекции сифилиса и ВИЧ. Симптомы могут появляться через несколько дней после заражения - от 14 до 90 дней, в среднем - на 21 день (Golden MR, 2003; Sparling PF, 1999). При первичном сифилисе на месте внедрения возбудителя (чаще это - слизистые гениталий или ануса) образуется одна язва (называемая шанкром), но возможно образование и большего количества язв. Пациенты могут не подозревать о своем заболевании, особенно если эти, в основном, безболезненные образования, располагаются во влагалище или в анусе. Может развиваться местная лимфаденопатия. Вторичное инфицирование язвенных дефектов может сопровождаться болезненными симптомами и/или аденопатией. В дальнейшем, обычно на стадии вторичного сифилиса, шанкр спонтанно заживает, независимо от наличия или отсутствия лечения.

При вторичной стадии сифилиса типичными симптомами являются местная или генерализованная сыпь и поражение слизистых. Сыпь может варьировать от макулярной, папулезной, пустулярной, папулосквамозной до ануляр-

ной; элементы высыпаний могут быть бледными или ярко красными; локализоваться на ладонях и подошвах. Могут также наблюдаться и общие симптомы, такие как: боль в горле, субфебрильная температура, недомогание, боли в суставах и мышцах, генерализованная лимфаденопатия. Среди более редких проявлений сифилиса необходимо отметить пятнистый сифилид на слизистой оболочке гортани, сифилитические кондиломы, лентикулярные папулы (локализующиеся в естественных складках кожи), а также сифилитическую аллопецию. Кожные проявления вторичного сифилиса могут напоминать другие заболевания, такие как разноцветный (отрубевидный) лишай, розовый лишай, чесотку, медикаментозную сыпь и полиморфную эритему; у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих ВААРТ, такие проявления могут быть расценены как реакция на антиретровирусные препараты.

Таким образом, наиболее заразны больные на ранних стадиях инфекции (первичной и вторичной), поскольку твердый шанкр, пятнистый сифилид и кондиломы - высокоинфекционные очаги поражения. Исключение составляет сухая кожная сыпь, которая в основном не является инфекционной. Также как и первичный шанкр, вторичные проявления исчезают при отсутствии терапии, означая начало латентного периода заболевания.

На стадии латентного сифилиса, несмотря на отсутствие клинических проявлений первичного и вторичного сифилиса, выявляются серологические маркеры. Рецидив симптомов вторичного сифилиса может происходить на ранней латентной стадии. Центром по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) ранняя латентная стадия определена как инфекция продолжительностью менее 12 месяцев, подтвержденная отрицательным результатом серологического исследования в предыдущие годы, проявлениями первичного или вторичного сифилиса или наличием сексуально-

го контакта с больным сифилисом на ранней стадии. В соответствии с этими критериями, при отсутствии фактов инфицирования в предыдущие 12 месяцев, продолжительность скрытой инфекции считается неизвестной; в этом случае инфекция именуется как "сифилис неустановленной продолжительности". При негативном результате или 4 кратном снижении титра антител в нетрепонемном серологическом тесте более 12 месяцев назад, определить время инфицирования невозможно, даже при наличии информации о высоко рискованном сексуальном поведении пациента.

На стадии третичного сифилиса основными клиническими манифестациями инфекции могут быть кардиоваскулярные проявления, такие как сифилитический аортит, осложненный аневризмой аорты, поздние неврологические осложнения, а также развитие в органах и системах сифилитического продуктивно-некротического воспаления в виде формирования гумм (безболезненных, деструктивных гранулематозных язв). Нейросифилис - не стадия, а позднее проявление сифилиса, характеризующееся поражением нервной системы.

### Модификация клинических проявлений коинфекции ВИЧ/*Treponema pallidum*: возвращение "великого имитатора"

В проспективном исследовании по оценке эффективности лечения больных сифилисом на ранних стадиях (Rofls RT et al., 1997) с участием 101 ВИЧ-инфицированного пациента, не было выявлено атипичного течения сифилитической инфекции. Однако существует множество описанных ранее случаев, когда сопутствующая ВИЧ-инфекция изменяет клиническую картину сифилиса в сторону минимизации его проявлений (табл. 1) (Collis TK, 2001; Musher DM, 1990; Hutchinson CM, 1994; Rompalo AM, 2001)

Таблица 1

#### Атипичные черты сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов, описанные в медицинской литературе

Стадии сифилитической инфекции	Проявления, характерные для ВИЧ-инфицированных пациентов	Литература
Первичная	Множественные твердые шанкры	Rofls RT, 1997, Rompalo AM, 2001
Вторичная	В качестве начальных более вероятны вторичные проявления	Hutchinson CM, 1994
	Первичный аффект (твердый шанкр) при вторичном сифилисе чаще сохраняется	Hutchinson CM, 1994, Rompalo AM, 2001
Любая	Высокие титры нетрепонемных тестов	Rofls RT, 1997
	Увеличение частоты ЛПР на сифилис	Pompalo AM, 2001, Yinnon AM, 1996 Joyanes P, 1998, Malone JL, 1995
	Чаще отсутствуют изменения серологических маркеров после лечения	Yinnon AM, 1996, Rofls RT, 1997
	Увеличение частоты эффекта прозоны	Jurado RL, 1993
	Увеличение частоты реакции Яриша-Герксхаймера	Rofls RT, 1997
Неврологические проявления	Замедленная нормализация показателей СМЖ после лечения нейросифилиса	Marra CM, 2004

По результатам одного из исследований, у 70% ВИЧ-инфицированных пациентов первоначально встречались множественные шанкры (а не единичный), в отличие от ВИЧ-негативных, у которых таковые встречались в 34% случаев ( $p < 0,05$ ) (Rofls RT, 1997). Другие исследователи подтверждают, что язвенные поражения могут быть более тяжелыми и/или медленно заживающими, но эти данные недостаточно достоверны. Однако в другом исследовании установлено, что среди пациентов с коинфекцией вторичного сифилиса и ВИЧ, персистирующие генитальные язвы встречались в 25% случаев, по сравнению с 14% случаев среди ВИЧ-негативных лиц (Romalo AM, 2001). Таким образом, одновременное наличие признаков вторичного и первичного сифилиса не должно быть основанием для сомнений в правильности диагноза. Кроме того, при подозрении на вторичный сифилис, целесообразно проведение тщательного генитального и ректального обследования для обнаружения первичного шанкра в стадии разрешения.

### Неврологические проявления при коинфекции ВИЧ/*Treponema pallidum*

Проникновение инфекции в центральную нервную систему (ЦНС) может происходить на любом этапе инфекционного процесса (Lukehart SA, 1988). Следовательно, неврологические проявления, включая нейросифилис, могут появляться как на протяжении первичной, вторичной и ранней латентной, так и поздних стадиях сифилиса (Simon RP, 1985).

### Офтальмологические и отоларингологические осложнения

У пациентов с коинфекцией ВИЧ и сифилиса могут развиваться офтальмологические и отоларингологические осложнения, о чем должны помнить врачи-клиницисты. Клинические проявления со стороны органа зрения включают увеиты (Shalaby IA, 1997), хориоретиниты (Gass JD, 1990), и ретробульбарные невриты (Zaidman GW, 1986). Среди них, увеиты встречались чаще и были обнаружены у 10% пациентов с положительным результатом исследования ликвора в трепонемном тесте (Flood J.M., 1998). В редких случаях, возможно отслоение сетчатки, которое может привести к слепоте. Осложнения со стороны органа слуха происходят не часто и проявляются асимметричной потерей слуха, шумом в ушах или вестибулярными нарушениями. Увеличивается ли вероятность развития описанных осложнений у ВИЧ-инфицированных неясно - надежный клинический критерий еще не определен.

### Нейросифилис

Считается, что в нормально функционирующем организме, иммунологические механизмы осуществляют контроль над инфекцией ЦНС, даже при отсутствии терапии (Lukehart SA, 1980).

В недавнем исследовании вновь был поднят вопрос - чаще ли возникают неврологические осложнения у ВИЧ-инфицированных пациентов (Magra SM, 2004). Степень достоверности лабораторных или клинических критериев диагностики таких осложнений до сих пор до конца

не определена. Более того, иммуносупрессия, возникающая в результате применения ВААРТ, делает понимание этой проблемы еще более трудным. Многочисленные исследования не выявили различий в детекции *T. pallidum* при помощи ПЦР у ВИЧ-инфицированных и неинфицированных пациентов.

При раннем нейросифилисе, который может быть бессимптомным и возникать вскоре после инфицирования, в первую очередь страдают кровеносные сосуды и мягкие мозговые оболочки. Ранние проявления нейросифилиса - сифилитические менингиты и менинговаскулярный сифилис с вовлечением в процесс черепно-мозговых нервов и/или органа зрения, а также острые нарушения мозгового кровообращения. При позднем нейросифилисе в процесс вовлекаются мозговые оболочки и вещество головного мозга или спинной мозг. Это, в основном, происходит спустя годы после инфицирования и приводит к более тяжелым, но редким последствиям - общему параличу, хроническому менингоэнцефалиту, сухотке спинного мозга (tabes dorsalis), к повреждению задних столбов спинного мозга, приводящего к сенсорным нарушениям, дисфункции желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря.

Результаты эпидемиологических исследований позволяют предположить, что частота клинически выраженного нейросифилиса не увеличивается в связи с ВИЧ-инфекцией. При проведении ретроспективного исследования в Сан-Франциско в период с 1985 по 1992 гг., было выявлено от 2 до 9 случаев нейросифилиса в год. В течение всего периода исследования этот показатель не возрастал, несмотря на очень высокую заболеваемость сифилисом в США в начале 80-х годов и развитие эпидемии ВИЧ-инфекции (с 116 до более 3000 случаев) за 10 лет до 1992 года (Flood JM, 1998). Результаты более поздних исследований также показали низкий уровень лабораторно подтвержденного нейросифилиса; в 2002 году в Сан-Франциско нейросифилис был выявлен только в 2,3% (14/602) случаев сифилиса (с учетом всех стадий).

Тем не менее, учитывая недостаток данных о частоте и значимости неврологических осложнений у пациентов с коинфекцией ВИЧ и сифилиса, а также данных о необходимости применения прокаина-пенициллина или водного раствора кристаллического пенициллина G (ВКПГ) для лечения этих клинических проявлений, крайне важным является тщательное выявление и оценка неврологических проявлений у всех больных сифилисом. Особое внимание следует обращать на повреждение черепно-мозговых нервов. Кроме того, нейросифилис и сифилис глаз необходимо подозревать у любого ВИЧ-инфицированного пациента с неврологическими симптомами и нарушениями зрения.

### Диагностика сифилиса

Несмотря на незначительные различия в клинических проявлениях, диагностика сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов, проводится согласно общепринятым критериям. Обзор методов диагностики сифилиса и лечение его у ВИЧ-инфицированных пациентов представлен на рис. 1

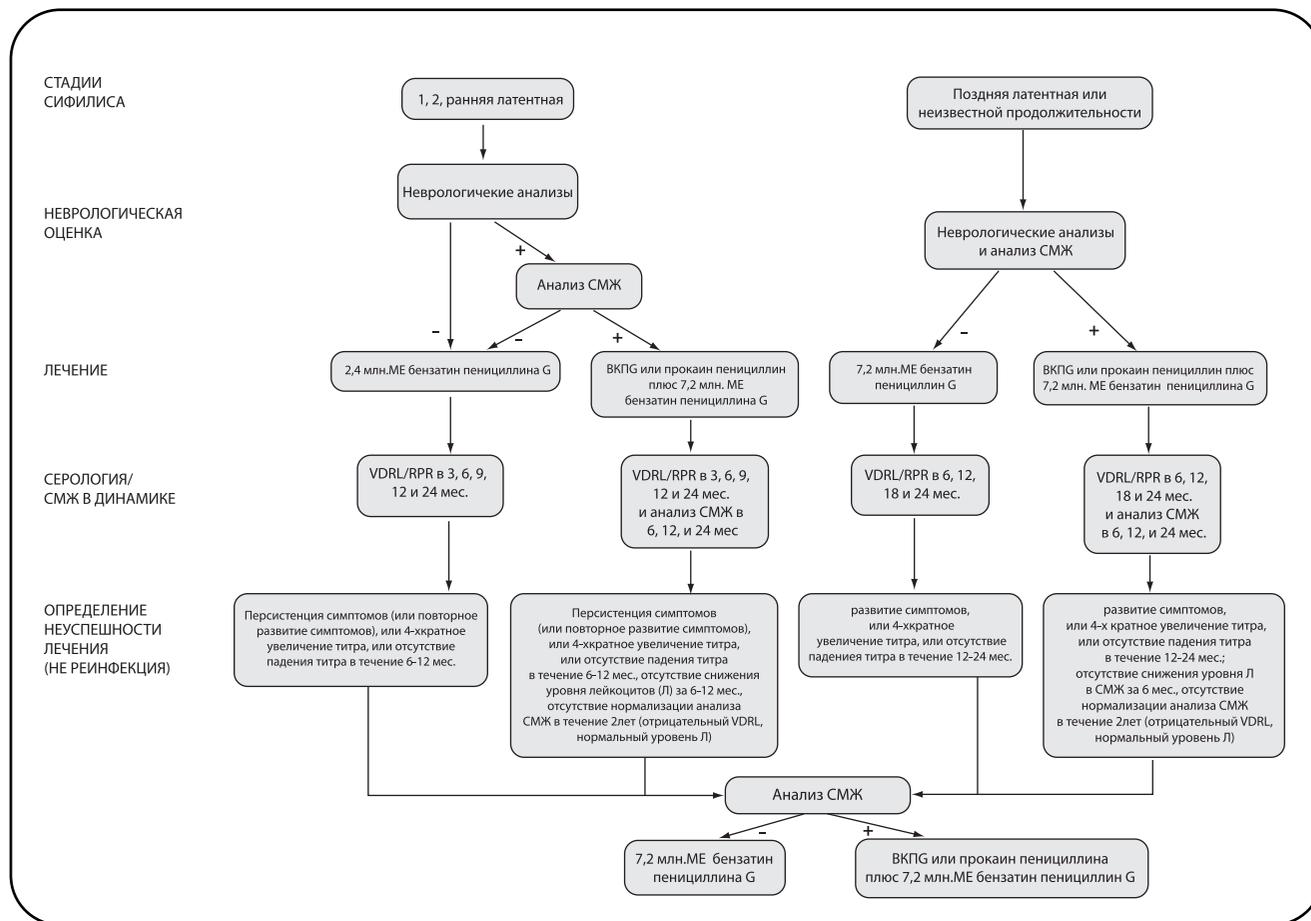


Рис. 1. Алгоритм ведения пациентов с коинфекцией ВИЧ и сифилиса

### Использование серологических тестов

В качестве антигена для проведения нетрепонемных тестов используется стандартный кардиолипин-лецитин-холестероловый антиген для определения количества антилипидных антител. К нетрепонемным тестам относятся RPR-тест (тест быстрых плазменных реагинов, Rapid Plasma Reagins) или Venereal Disease Research Laboratory test (VDRL-тест), часто использующиеся при проведении начальной диагностики сифилиса. Трепонемные тесты (агглютинационные, например, TP-PA; иммунофлуоресцентные, например, FTA-Abs) используются для подтверждения результатов нетрепонемных тестов. В целом, интерпретация этих тестов не изменяется при коинфекции ВИЧ и *T. pallidum*. Тем не менее, серологическое тестирование не следует считать единственным способом диагностики сифилиса. Для подтверждения диагноза необходимо учитывать все доступные сведения - данные истории болезни, информацию о сексуальных партнерах, результаты клинико-лабораторных исследований и предыдущих серологических анализов, а также результаты биопсии очагов поражения (проведенной в случае необходимости).

### Ошибки при диагностике ранних форм сифилиса

Чувствительность серологических тестов на сифилис увеличивается с продолжительностью инфекции и варьирует от 75% на начальной стадии до 100% на вторичной стадии (Larsen SA, 1995). В целом, нетрепонемные и тре-

понемные тесты обладают одинаково высокой чувствительностью у ВИЧ-инфицированных и ВИЧ-негативных пациентов; результаты этих тестов следует интерпретировать стандартно. В связи с тем, что чувствительность нетрепонемных и трепонемных тестов ниже на первичной стадии, отрицательный результат серологического теста у ВИЧ-инфицированных пациентов с генитальной язвой не исключает наличия первичного сифилиса. Хотя авторы некоторых публикаций в начале 90-х годов описывали ложно-негативный результат серологических тестов у ВИЧ-инфицированных пациентов с вторичным сифилисом (Hicks CB, 1987; Tikjob G, 1991), в последнее десятилетие не было опубликовано работ, подтверждающих эти наблюдения.

Феномен прозоны может быть причиной ложноотрицательных результатов нетрепонемных тестов, обычно во время вторичного периода сифилиса, когда высокие концентрации трепонемного антигена не позволяют определить иммунный комплекс антиген-антитело. Это препятствие может быть устранено дополнительным разведением образцов, о чем должен иметь представление врач-клиницист и назначать дополнительное исследование в случае подозрения на сифилис (несмотря на отрицательный результат нетрепонемных тестов). Хотя некоторые авторы и полагают, что данный феномен чаще происходит при коинфекции ВИЧ и сифилиса, точные доказательства этого отсутствуют (Jurado RL, 1993).

Особую озабоченность вызывает отсутствие усовершенствованных тестов для диагностики первичной стадии сифилиса (так как негативный результат серологического

исследования не гарантирует отсутствие инфекции). Большинство лабораторий не имеют возможности для проведения исследований методом темнопольной микроскопии. Хотя был разработан мультиплекс-ПЦР тест с высокой чувствительностью (около 95%) при определении возбудителей сифилиса, простого герпеса и шанкроида ("мягкого шанкра") использование данного теста для коммерческих целей не предполагается.

В связи с тем, что у ВИЧ-инфицированных пациентов диагностика сифилиса может быть затруднена, необходимо проводить прямую идентификацию возбудителя в тканях очагов поражений. В тех случаях, если проведение данного вида исследования невозможно, если получены сомнительные или негативные результаты серологических тестов, а клинический индекс подозрения высок, оправданно предварительное лечение, с проведением повторного тестирования через 1-2 недели для определения отсроченного антительного ответа. Очевидные факты наличия сифилиса на фоне сомнительных и отрицательных результатов серологических тестов требуют проведения дополнительного обследования пациентов.

#### Ошибочная диагностика сифилиса у пациентов, не инфицированных *T. pallidum*

Специфичность нетрепонемных тестов, также может быть изменена из-за наличия ВИЧ-инфекции. У ВИЧ-инфицированных чаще, чем у неинфицированных, причиной биологического ложноположительного результата или повышенных титров нетрепонемного теста может быть неспецифическая активация В-клеток (Joyanes P, 1998; Rompalo AM, 1992). В целом, положительные результаты нетрепонемных тестов,

особенно при титрах антител выше 1:8, следует трактовать как показатель активной инфекции, с обязательным тестированием в подтверждающем (подтверждающем) тесте. Влияние ВИЧ на специфичность нетрепонемных тестов также мешает динамическому наблюдению за уровнем иммунного ответа (колебанием титров антител) у сексуально активных ВИЧ-инфицированных пациентов, ранее лечившихся от сифилиса. У таких пациентов, невозможно определить, чем вызвано повышение титра антител - новой инфекцией, реактивацией старой инфекции или ВИЧ-инфекцией. Выбор тактики лечения во многом определяется результатами оценки поведенческих факторов риска и вероятности неудачного лечения.

#### Диагностика нейросифилиса

У ВИЧ-инфицированных пациентов, нейросифилис следует дифференцировать от других заболеваний с неврологической симптоматикой. В таких случаях необходимо проведение исследований с использованием основных серологических тестов на сифилис и соответствующих методов диагностики для определения поражения ЦНС (рис.2).

Хотя *T. pallidum* может быть выделена из спинномозговой жидкости (СМЖ) у ВИЧ-инфицированных пациентов с ранним сифилисом бессимптомного течения, клиническая и прогностическая значимость данного исследования остается неясной. Кроме того, метод ПЦР недостаточно чувствителен при исследовании СМЖ с целью детекции *T. pallidum* для диагностики нейросифилиса (Rofls RT, 1997). Несмотря на многочисленные интенсивные экспериментальные и теоретические исследования, пока не достигнуто согласие при решении вопроса о необходимости исследования СМЖ при наличии сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов.



Рис. 2. Оценка состояния ЦНС у пациентов с коинфекцией ВИЧ и сифилиса.

Диагностика нейросифилиса основывается на позитивных результатах тестирования образцов СМЖ. Эти анализы включают:

1) положительный результат VDRL-теста;

2) в случае отрицательного результата VDRL-теста - плеоцитоз (более 10-20 белых кровяных клеток в мм<sup>3</sup>) с наличием (или без) повышенной концентрации белка (более 45 мг/дл) при отсутствии других известных причин этих нарушений.

Однако повышенный уровень лейкоцитов или белка в СМЖ не являются абсолютным критерием установления диагноза сифилиса, т.к. эти показатели могут быть повышенными и при естественном течении ВИЧ-инфекции (Hollander H, 1988). Хотя иммунофлюоресцентный тест (FTA-ABs) не имеет достаточной специфичности при исследовании СМЖ, негативный результат обладает высокой отрицательной прогностической ценностью и рекомендован некоторыми экспертами для исключения нейросифилиса в случае отрицательных результатов VDRL при исследовании СМЖ, когда обнаружены минимальные отклонения от нормы в содержании лейкоцитов и/или белка.

Опубликованы критерии (показания) для назначения люмбальной пункции (ЛП) при выявлении больных с высоким риском неврологических осложнений. Rolfs RT и соавт. (Rolfs RT, 1997) описали неблагоприятные эффекты, обусловленные интенсивным лечением нейросифилиса на ранней стадии. Специалисты CDC рекомендуют выполнять люмбальную пункцию всем ВИЧ-инфицированным пациентам с поздними формами сифилиса или с инфекцией неопределенной давности. Существуют также и другие критерии для назначения ЛП - неврологические, офтальмологические или отоларингологические симптомы, третичный сифилис или неудачное лечение.

Недавно Marra CM и соавт. (Marra CM, 2004) описали шестикратное увеличение риска развития нейросифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов с первичным, вторичным или латентным сифилисом при титре антител > или = 1:32, а также более чем 3-х кратное увеличение риска у этих пациентов при количестве CD4+ Т-лимфоцитов менее 350 кл/мм<sup>3</sup>. У пациентов с обоими факторами лабораторно подтвержденный нейросифилис был установлен в 18 раз чаще (Marra CM, 2004). Однако лонгитудинальные исследования не включали сравнение пациентов, получавших внутривенные инъекции пенициллина и пациентов с ранней латентной стадией сифилиса и титром антител > или = 1:32, получавших бензатин-пенициллин G (БПГ) внутримышечно, в соответствии с рекомендациями CDC.

Полученные данные побудили экспертов предложить подсчитывать CD4+ и устанавливать титр нетрепонемных тестов в СМЖ. Например, Kassutto S и Sax PE (2003) предлагают проводить ЛП у ВИЧ-инфицированных пациентов с титром нетрепонемных тестов > или = 1:32, независимо от стадии сифилиса или количества CD4+, также как у пациентов с ранней стадией инфекции и количеством CD4+ менее 350 кл/мм<sup>3</sup>, независимо от титра. Для пациентов с CD4+ > или = 350 кл/мм<sup>3</sup> и титром RPR-теста < или = 1:32 они не рекомендуют ЛП (Kassutto S, Sax PE 2003).

В силу существующих сложностей, постановка диагноза нейросифилиса и решение о проведении ЛП требует большого клинического опыта. Кроме того, клинические преимущества лечения лабораторно подтвержденного

нейросифилиса на ранней стадии сифилитической инфекции полностью не обоснованы. В настоящем обзоре подчеркивается необходимость исключения нейросифилиса у пациентов с высоким титром антител в крови и более активной ВИЧ-инфекцией, также как необходимость проведения динамического наблюдения за пациентами с ранним сифилисом, получавшими БПГ внутримышечно, при отсутствии анализов СМЖ.

## Лечение сифилиса

### Общие рекомендации

Препаратом выбора для лечения всех стадий сифилиса по-прежнему остается пенициллин пролонгированного действия (бензатин-пенициллин G, БПГ). При раннем сифилисе (первичном, вторичном или раннем латентном) следует назначать однократные инъекции БПГ (2,4 млн. МЕ, внутримышечно). При позднем латентном сифилисе или инфекции неизвестной давности - 3 раза в неделю (7,2 млн. МЕ БПГ), после чего назначают люмбальную пункцию для анализа СМЖ с целью исключения нейросифилиса (табл.2). У пациентов, ведущих активную половую жизнь, возможна недавняя инфекция с развитием симптомов и/или дальнейшим распространением инфекции. Поэтому исследование СМЖ (при наличии показаний) должно быть своевременным, чтобы не затягивать начало лечения.

Из-за текущей эпидемии среди мужчин-гомосексуалистов, в случае наличия у половых партнеров пациентов свежих генитальных язв, сыпи или бородавкоподобных образований, следует назначать лечение при первом визите, даже до получения результатов серологических тестов. В большинстве стандартов при подозрении на определенные инфекции рекомендовано начинать лечение как можно раньше, не дожидаясь результатов подтверждающих тестов. Дополнительно, в связи с тем, что титры антител могут быстро увеличиваться при ранней инфекции, серологические исследования должны проводиться в день назначения лечения, поскольку полученные результаты будут учитываться при дальнейшем контроле эффективности лечения. Даже если анализ был сделан за 2 недели до визита к врачу, его следует повторить в день назначения лечения.

Для лечения раннего сифилиса у ВИЧ-негативных лиц, небеременных, а также для лиц с аллергией на пенициллин альтернативными препаратами являются доксициклин и тетрациклин, с успехом используемые на протяжении нескольких десятилетий. Однако применение больших доз в течение длительного срока (14 дней), а также появление данных о возможных неблагоприятных побочных эффектах препаратов, значительно снижает их эффективность по сравнению с БПГ. Применение этих препаратов у ВИЧ-инфицированных пациентов не изучалось; поэтому они не являются стандартом терапии при данном заболевании. Их применение требует осторожности и пристального наблюдения за результатами клинических и серологических исследований.

Для лечения раннего сифилиса представляет интерес применение азитромицина с высокой проникающей способностью и длительным периодом полувыведения (Rapp RP, 1998), однако долгосрочная эффективность такой терапии изу-

чена недостаточно. Некоторые авторы рекомендуют однократное пероральное применение препаратов, поскольку инъекционное введение БПГ неприемлемо для некоторых пациентов. Кроме того, возможно использование азитромицина для лечения половых партнеров пациента, что является перспективным для предотвращения распространения этой социально опасной инфекции. В одном из исследований было описано применение азитромицина (96% пациентов - ВИЧ-негативные) в дозе 2г однократно или по 2г дважды в течение недели, что показало лучшую эффективность по сравнению с БПГ. Серологический ответ в течение 12 месяцев наблюдался у 86% пациентов, получавших пенициллин, у 94% и 83% пациентов, получавших азитромицин однократно или двукратно, соответственно (Hook EW, 2002). Однако применение азитромицина в груп-

пах ВИЧ-инфицированных пациентов или больных поздним сифилисом не изучалось, поэтому он не может рассматриваться в качестве стандартной терапии. При его использовании необходимо проводить анализ клинических проявлений и тщательный серологический мониторинг.

Было показано, что реакция Яриша-Герксхаймера - острый системный ответ, связанный с освобождением трепонемного антигена и эндотоксина, наблюдаемая иногда в начале лечения - чаще встречается у ВИЧ-инфицированных пациентов. Rofls RT и соавт. (1997) наблюдали данную реакцию у 22% ВИЧ-инфицированных и только у 12% ВИЧ-негативных пациентов ( $p=0,02$ ). Отмечены гриппоподобные симптомы, включающие лихорадку, дисфонию, боль в суставах, а также появление выраженной сыпи и язвенных поражений кожи и слизистых.

Таблица 2.

## Лечение сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов.\*

ПЕРВИЧНАЯ, ВТОРИЧНАЯ И РАННЯЯ ЛАТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ
Бензатин-пенициллин G, 2,4 млн. МЕ внутримышечно, однократно
<i>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</i>
Альтернативное лечение (тетрациклин, азитромицин) недостаточно изучено для ВИЧ-инфицированных пациентов; рекомендуется тщательное диспансерное наблюдение. Наблюдение включает в себя клиническое исследование через 1 и 2 недели после оценки симптомов и серологических маркеров на 3, 6, 9, 12 и 24 месяца после начала лечения.
ПОЗДНЯЯ ЛАТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ НЕИЗВЕСТНОЙ ДАВНОСТИ
<i>ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</i>
Люмбальная пункция для оценки исследования СМЖ до лечения
<i>ЛЕЧЕНИЕ</i>
Если нормальные показатели СМЖ, назначается бензатин-пенициллин G в общей дозе 7,2 млн. МЕ, разделенной на 3 приема в течение 1 недели, внутримышечно. В противном случае, проводится лечение нейросифилиса (см. ниже).
<i>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</i>
Альтернативное лечение (тетрациклин) недостаточно изучено для ВИЧ-пациентов; в случае назначения для лечения поздней инфекции, рекомендуется тщательное наблюдение. Наблюдение включает оценку симптомов и серологических маркеров через 6, 12, 18, 24 месяца после лечения.
НЕЙРОСИФИЛИС (ВКЛЮЧАЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИЕ И ОТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ)
Водный раствор кристаллического пенициллина G, по 18-24 млн. МЕ в день (3-4 млн. МЕ каждые 4 часа) в течение 10-14 дней.
<i>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</i>
Для пациентов, четко соблюдающих предписание врачей, приемлемо альтернативное назначение прокаина-пенициллина по 2,4млн. МЕ, внутримышечно 1 раз в день, плюс 500мг пробенецида, перорально 4 раза в день в течение 10-14 дней; менее изучено альтернативное внутривенно применение цефтриаксона по 2г ежедневно в течение 14 дней. Большинство экспертов после окончания альтернативного метода рекомендуют бензатин-пенициллин G в общей дозе 7,2 млн. МЕ, разделенной на 3 приема в течение недели, внутримышечно,
БЕРЕМЕННЫЕ И ПАЦИЕНТЫ С АЛЛЕРГИЕЙ НА ПЕНИЦИЛЛИН
Альтернативные пенициллину препараты (тетрациклины, азитромицин) для ВИЧ-инфицированных пациентов недостаточно изучены. Тетрациклины противопоказаны при беременности. Пробенецид не следует назначать пациентам с аллергией на сульфамидные препараты. Рекомендовано проведение кожной пробы и/или гипосенсибилизации для облегчения терапии пенициллином у беременных женщин и для лечения поздних стадий сифилиса и нейросифилиса у прочих пациентов с ВИЧ-инфекцией.

\* Рекомендовано Центром по контролю и профилактике заболеваний, США (CDC)

## ВИЧ-инфекция

### 12/401 Скрининг ВИЧ-инфекции: роль молекулярных и иммунологических тестов. Обзор.

B.Weber

Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays.

Expert Rev Mol Diagn., 2006; 6(3):399-411

PMID: 16706742

(Продолжение. Начало читайте в №1-2008г.)

#### Тесты на основе амплификации нуклеиновых кислот

##### Технические достижения

В настоящее время для проведения рутинных лабораторных анализов, в частности осуществления скрининга донорской крови, используются полностью укомплектованные, готовые к использованию наборы для выделения нуклеиновых кислот. Однако подготовка образцов вручную по-прежнему остается основным ограничивающим фактором при высокой пропускной способности анализа и представляет ту часть анализа, в которой наиболее вероятны ошибки. В связи с этим было необходимо разработать автоматизированные методы выделения нуклеиновых кислот. Разработанные методы подошли для большинства тест-систем (Tigris®, Gen-Probe Inc., CA, USA; and Cobas AmpliPrep™, Roche Diagnostics, Пензберг, Германия), которые в настоящее время выпускаются серийно. Это позволило увеличить воспроизводимость результатов и снизить риск контаминации.

Системы, используемые для скрининга, являются качественными или полуколичественными. NAT - тесты могут применяться для моно- или полианализов при тестировании образцов крови доноров - индивидуальных или образцов из пулов донорской плазмы. NAT- тесты в реальном времени были разработаны для детекции продуктов амплификации во все фазы реакции, начиная с момента гибридизации во время амплификации. Метод не требует много времени, поскольку исключены постаплификационные манипуляции и, следовательно, сокращается риск контаминации. Использование флуоресцентных меток позволяет повысить чувствительность и установить линейную зависимость между количеством копий и сигналом. Следовательно, динамический диапазон точности NAT-тестов в реальном времени выше, чем стандартных амплификационных анализов. Для определения низких уровней РНК ВИЧ в начальной фазе репликации вируса при проведении скрининга донорской крови, были разработаны тесты с аналитической чувствительностью РНК ВИЧ-1 100 копий /мл и ниже.

В научной литературе опубликованы различные протоколы выделения, амплификации и детекции РНК (Jongorius JM, 2001; Candotti D, 2003; Koppelman MH, 2005; McCormick MK, 2006) . Они используются для скрининга ВИЧ-1-инфекции или коинфекции ВИЧ-1/ВГС.

На сегодняшний день только один тест с автоматической амплификацией и детекцией доступен на рынке—

Cobas AmpliScreen™ HIV v1.5 (Roche Diagnostics). Полностью автоматизированная (выделение, амплификация, детекция) тест-система для выявления ВИЧ и ВГС (Procleix® Tigris System HIV-1/HCV) была разработана компанией Gen-Probe Inc. в сотрудничестве с Chiron Corp. для скрининга донорской крови по индивидуальным образцам плазмы или минипулам.

AmpliScreen™ HIV v1.5 и Procleix® Tigris System HIV-1/HCV в 2002г. были одобрены Управлением по контролю продуктов и лекарств (FDA, США) в качестве тест-систем для скрининга донорской крови. Требование FDA относительно чувствительности NAT—систем при скрининге крови—чувствительность 95% при пороге обнаружения 100 копий/мл, тогда как, NAT скрининг-система должна иметь чувствительность, по крайней мере, 5000 копий/мл при анализе одной донации. Согласно стандартным техническим требованиям в рамках Директивы 98/79/ Европейского Сообщества (ЕС) для методов диагностики in vitro, серийные разведения, калиброванные по стандартам ВОЗ, необходимо исследовать как минимум 24 раза для получения статистически обоснованных результатов с достоверностью 95%. Порог обнаружения, при чувствительности теста AmpliScreen 95% в комбинации с полуавтоматическим способом выделения (Nucli-sens, bioMerieux), составляет около 30 геномных эквивалентов /мл для ВИЧ-1 субтипа В и циркулирующих рекомбинантных форм от A01\_АЕ. В более поздних исследованиях с помощью комплекса AmpliScreen/Nucli-sens был достигнут порог чувствительности определения 25 копий/мл для ВИЧ-1 субтипа G (Koppelman MH, 2005). Чувствительность AmpliScreen™ HIV v1.5, зависит от процедуры выделения. AmpliScreen™ HIV v1.5 в комбинации с полностью автоматизированным аппаратом AmpliPrep с серийными разведениями, калиброванными по стандартам ВОЗ, продемонстрировали чувствительность в два раза ниже, чем в комбинации с патентованным методом выделения Multiprep (Koppelman MH, 2005), однако критерии чувствительности, заданные FDA, по-прежнему соблюдались.

Хотя конкуренция между ампликонами ВИЧ-1 и ВГС может неблагоприятно отразиться на выходе амплификации ВИЧ-1, Procleix-тест на ВИЧ/ВГС демонстрирует аналогичную AmpliScreen HIV-1 v1.5 чувствительность (Lelie PN, 2002). Дополнительное отдельное определение РНК ВИЧ и ВГС используются для подтверждения положительного результата, полученного в ходе мультиплексного анализа. Определение уровня РНК ВИЧ-1 и/или ВГС подтверждает наличие инфекции и позволяет определить тип вируса. Когда образец, дающий реакцию при мультиплексном анализе, не подтверждается в конфирмационном тесте, результаты признаются неопределенными. Конфирмационные тесты позволили исключить инфекцию у 462 доноров с неопределенной реакцией (McAuley JD, 2004). Специфичность мультиплексных тест-систем близка к 100%, а уровень неопределенных результатов достаточно мал (0,0053 - 0,082%), при наличии соответствующего оборудования и опытных специалистов. Доля ошибок, обусловленная, в основном, человеческим фактором (нарушение временных параметров и неудовлетворительное смешивание реагентов на стадии экстракции) составляет 4,7% (Candotti D, 2003).

При скрининге индивидуальных образцов донорской крови значительно выше соотношение первоначально по-

зитивных образцов, которые впоследствии не подтверждаются (в Австралии были проведены исследования по сравнению эффективности тестирования индивидуальных образцов и минипулов).

Для использования в Европе был утвержден новый мультиплексный анализ на основе транскрипционно-опосредованной амплификации (ТОА) на ВИЧ-1, вирусы гепатитов В и С.

При использовании NAT-тестов диагностическое окно сокращается на 50% (11 дней), и остаточный риск снижается примерно на 50%. Теоретически все потенциальные вирусоносители могут быть исключены с помощью метода NAT, поскольку было показано, что при острой (первичной) инфекции, до появления РНК ВИЧ-1, они инфекционно безопасны (Murthy KK, 1999). Перемежающаяся вирусемия низкого уровня (менее 100 копий геномов/мл) может быть обнаружена высоко чувствительным NAT с лимитом детекции 4 копии/мл. На практике существует окно от начала инфекционно опасной стадии до обнаружения РНК ВИЧ, длительность которого зависит от объема образца и порога чувствительности NAT. Если инфекционную опасность считать доказанной при уровне РНК ВИЧ-1 в плазме 1 копия/мл, то окно при исследовании индивидуальной донации с помощью NAT-теста составит 5,6 дней. Для минипулов окно составит 3,4 дня, и будет зависеть от чувствительности используемой тест-системы NAT (Busch MP, 2005). Достижение большей чувствительности NAT по сравнению с серологическими анализами связано с техническими ограничениями. Автоматизация большого количества процессов, особенно выделения нуклеиновых кислот, по-прежнему сталкивается с техническими проблемами. ВИЧ-2 и ВИЧ-1 группы О не поддаются амплификации при помощи коммерческих тестов. Порог обнаружения NAT варьирует в зависимости от образца и серии. Несмотря на внедрение методов защиты от нецелевой амплификации, остается риск загрязнения теста.

#### **Снижение риска передачи ВИЧ-инфекции при трансфузии и оценка показателя затраты/эффективность при тестировании крови с использованием NAT**

В последнее время в Европе наблюдается значительное снижение количества случаев передачи вирусных инфекций (гепатитов С, В и ВИЧ) вследствие развития скрининг-диагностики, профилактических осмотров населения для контроля инфекций. Результаты общенациональных европейских исследований с использованием тестов только на антитела демонстрируют переменный низкий остаточный риск передачи ВИЧ-1 при трансфузии. Благодаря проведению NAT-тестов риск снизился примерно на 50%. NAT-тесты на ВИЧ стали обязательными в странах центральной Европы, включая Францию, Германию и Италию. Во Франции остаточный риск на  $10^6$  образцов донорской крови без NAT-тестов снизился с 1,68 до 0,73. С помощью NAT он был сокращен более чем на 50%, упав до 0,32, что составляет менее одного случая инфицирования в год по всей Франции (Pillonel J, 2005). В исследовании, проводившемся в Германии предполагалось, что уровень остаточного риска составит 0,36 и 0,43 за период 2001-2002гг. и 2000-2001гг., соответственно. Благодаря дополнительному включению NAT-тестов (Tagman ПЦР) для обследования пулов (вплоть

до 96 образцов), остаточный риск был снижен практически на 50%, до значения 0,18 и 0,22 за период 2001-2002гг. и 2000-2001гг., соответственно. В Италии за период с 2001 по 2003гг. 2186468 доноров были обследованы преимущественно с помощью мультиплексного транскрипционно-опосредованного анализа индивидуальных донаций или минипулов по 1-24 донаций (метод AmpliScreen HIV-1 vl.5). Были обнаружены положительные результаты у 4 доноров при использовании только NAT. Остаточный риск при использовании только диагностикумов для определения антител составил 2,2; при использовании NAT ожидалось, что его величина составит 1,1 (Velati C, 2005). В США за период с 1999 по 2002 г. риск при использовании NAT составил 1 случай на 3,1 млн. (Stramer SL, 2004), сходные результаты получены во Франции. Эти данные демонстрируют ограниченную пользу и низкий показатель затраты/эффективность. Стоимость анализа всех донаций крови в США с помощью NAT-тестов на ВИЧ и ВГС оценивается в пределах от 150 млн. долларов (NAT-тестирование минипулов) до 428 млн. долларов (NAT-тестирование индивидуальных образцов) в год и предотвращает от 4 до 7 случаев ВИЧ-инфицирования и 56-59 случаев инфицирования ВГС (Jackson BR, 2003). Следует существенно сократить стоимость тестирования, чтобы сделать затратно-эффективность соответствующей другим доступным медицинским практикам. Следует подчеркнуть, что недавнее увеличение случаев ВИЧ в некоторых европейских странах должно быть тщательно изучено для выявления возможных изменений характеристик доноров и пересчета затратно-эффективности скрининга на основе NAT.

#### **Могут ли NAT-тесты использоваться в качестве самостоятельного метода при скрининге донорской крови?**

Основная цель NAT-тестов при скрининге крови - сокращение серологического окна. Поскольку этот новый метод скрининга теоретически покрывает весь период инфекционности, необходимость использования серологических анализов при скрининге вызывает сомнения. Однако NAT-тесты не могут использоваться в качестве самостоятельного метода лабораторной диагностики и для скрининга донорской крови, так как наблюдаются ложноотрицательные результаты среди инфицированных лиц с низкой вирусной нагрузкой (Barlov KL, 1997). В наборе из 35 образцов от ВИЧ-1 положительных пациентов с антительным ответом, имеющих устойчиво низкую нагрузку РНК (< 400 копий/мл) при отсутствии антивирусной терапии NAT-тесты минипулов и индивидуальных образцов были не в состоянии определить 15 и 4 образца, соответственно (Laperche S, 2003).

#### **Ограничения NAT-тестов при скрининге пулов образцов**

Во многих банках крови в настоящее время используется метод определения РНК ВИЧ-1 в пуле образцов, поскольку затратно-эффективность таких тестов выше, чем тестирование индивидуальных образцов (Roth WK, 1999). Чувствительность определения нуклеиновых кислот главным образом зависит от объема образца и чувствительности самого теста. При тестировании минипулов с порогом

обнаружения РНК ВИЧ 200 копий/мл диагностическое окно было сокращено до 11,7 дня по сравнению с использованием тестов на антитела. Это примерно на 2 дня больше, чем при тестировании индивидуальных образцов (Le Corfec E, 1999). Если выборка включает 100 донаций, средняя продолжительность диагностического окна составляет 9,8 дня по сравнению с тестами на антитела. В целом временное преимущество составляет 4,3 дня по сравнению с определением p24-антигена. При тестировании выборок большего размера или использовании NAT-тестов с меньшей чувствительностью, тестирование на антиген p24 ВИЧ становится более точным. Однако NAT-тесты по объединенным выборкам более затрато-эффективны, чем определение антигенов в индивидуальных образцах (Quinn TC, 2000).

В октябре 1997г. в Сингапуре были проведены исследования двух инфицированных реципиентов компонентов крови с циркулирующей рекомбинантной формой ВИЧ-1 CRF A01\_AE (ранее классифицированный как субтип E) и донор с отрицательным результатом тестирования на антигены и антитела ВИЧ в период забора крови. Было сделано предположение о низком уровне виремии (5-39 копий/мл) в цельной донорской крови на момент забора. Дополнительное тестирование при скрининге минипулов продемонстрировало сопоставимые результаты при определении РНК ВИЧ-1 в неразведенной донорской плазме, несмотря на противоречивость результатов при уровнях разведения 1/16 и 1/24 при скрининге минипула (Ling AE, 2000). Описан случай передачи ВИЧ через эритроциты, полученные до начала сероконверсии (Delwart EL, 2004). Вирусная РНК была достоверно определена с помощью NAT-теста в индивидуальной пробе, в то время как такой же анализ минипулов давал противоречивые результаты.

Во Франции в ходе годового исследования NAT-тестов из 2,5 млн. протестированных образцов донорской крови был выявлен 1 РНК ВИЧ-1 позитивный образец при отрицательном анализе на антитела. Два образца с отрицательным анализом на антитела, позитивные в NAT, при индивидуальном тестировании в связи с очень низкой вирусной нагрузкой, были пропущены даже при проведении анализа 8 минипулов (Assal A, 2003).

#### Продуктивность NAT-тестов и тест-систем четвертого поколения при тестировании лиц из групп риска по ВИЧ в клинических и диагностических лабораториях

Совместное использование NAT -тестов и тестирования на антитела к ВИЧ в группах риска по ВИЧ-инфекции позволяет существенно повысить степень выявления ВИЧ-инфекции без ухудшения качества проведения диагностических процедур. В обзорном исследовании в Нью-Йорке (США) за 12 месяцев было выявлено 23 пациента с острой фазой инфекции среди 109 250 лиц при тестировании при помощи только NAT. Было получено 2 ложноположительных результата. У 16 (0,015%) из 23 пациентов имелись доказательства передачи вируса при половом контакте. С помощью предпринятых мер по предотвращению ВИЧ 48 половых партнеров и 1 новорожденный из группы риска были защищены от заражения ВИЧ (Pilcher CD, 2005). Расчетная чувствительность стандартных тестов на антитела составила 96,2%.

При использовании ИФА четвертого поколения (предел

обнаружения p24 - 20 пг/мл) степень выявления первично инфицированных с отрицательным тестом на антитела повысилась по сравнению с исследованиями, проведенными во Франции в 1998г. В течение 9 месяцев в пяти государственных и частных лабораториях Франции проводились исследования по выявлению первично инфицированных. В четырех из пяти лабораторий часть обследованных составили пациенты группы риска (Ly TD, 2000). Из 29657 протестированных образцов 17 (0,057%) были определены как положительные только с помощью анализов четвертого поколения, при последующих тестированиях и/или с помощью NAT-тестов было установлено, что образцы принадлежат первично инфицированным. В отличие от NAT-тестов, при использовании тест-систем четвертого поколения для исследования большого количества образцов (n=143; 0,49%) были получены ложноположительные результаты. Чувствительность тест-систем третьего поколения составила 96,4%. Более высокие цифры, полученные во французских исследованиях, могут быть связаны с большим процентом ВИЧ-инфицированных в исследуемой популяции.

#### Антиген ВИЧ

Антиген ВИЧ - второй после РНК вирусный маркер, который может быть определен у первично инфицированных ВИЧ. В странах центральной Европы для скрининга донорской крови систематически проводятся анализы на выявление антигена ВИЧ в индивидуальных образцах донорской крови. Хотя стоимость NAT-тестов индивидуальных донаций или минипулов ниже, их затрато-эффективность сомнительна. (Pilcher CD, 2005). В клинических лабораториях анализ на антиген ВИЧ как альтернатива NAT-тестам может использоваться в качестве самостоятельного анализа у первично инфицированных. В проспективном исследовании, проведенном в округе Лос-Анжелес, целью которого была оптимизация диагностики первично инфицированных, ложноположительные результаты чаще встречались при использовании NAT-тестов, чем при проведении анализов на антиген p24 (Daar ES, 2001).

Другая сфера применения качественных анализов на антиген ВИЧ - исследование повторно позитивных образцов при помощи тест-систем четвертого поколения, поскольку эти иммунологические анализы требуют специального алгоритма для подтверждения (см. рисунок). Для подтверждения наличия антител к ВИЧ первоначально необходимо переставить образец в тест-системе для определения только антител. Если анализ положительный, следует провести иммуноблот. Для подтверждения реактивности по антигену p24 следует использовать систему для определения только антигена ВИЧ. Положительные образцы по антигену p24 ВИЧ следует проверить в NAT-тесте. В связи с этим в лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции качественные реакции на антиген ВИЧ играют большую роль для характеристики повторно позитивных образцов при скрининговом исследовании при помощи тест-систем четвертого поколения. Для соответствия требованиям современной лабораторной диагностики эти тесты должны быть воспроизводимыми и простыми в исполнении, а потенциальные источники лабораторных ошибок должны быть сведены к минимуму.

Существует некоторая разница в чувствительности и специфичности тестов для определения антигенов ВИЧ,

что является следствием качества иммобилизованных антител (моноклональные или поликлональные) или материала для сорбции антител. Была описана неспособность моноклональных антител определить антиген р24 в известных штаммах ВИЧ-1 группы М (Tersmette M, 1989; Van den Haesevelde M, 1994), ВИЧ группы О и ВИЧ-2 (Maniez M, 1997).

Чувствительность серийно выпускаемых тест-систем для определения антигена р24 ВИЧ для различных субтипов ВИЧ-1 зависит от индивидуальных тестируемых образцов (Weber W, 2002). Для определения параметров тестов на

антиген, необходимо протестировать большое количество панелей образцов различных субтипов, которые могут быть доступны для производства и исследований. Поскольку постоянно растет заболеваемость ВИЧ-1 не В субтипов, тест-системы на ВИЧ антиген должны с одинаковой чувствительностью определять все субтипы ВИЧ-1. В развитых странах NAT-тестирование для наблюдения за ВИЧ-инфицированными, мониторинга антиретровирусной терапии и диагностики вертикальной передачи инфекции вытеснило определение антигена ВИЧ.

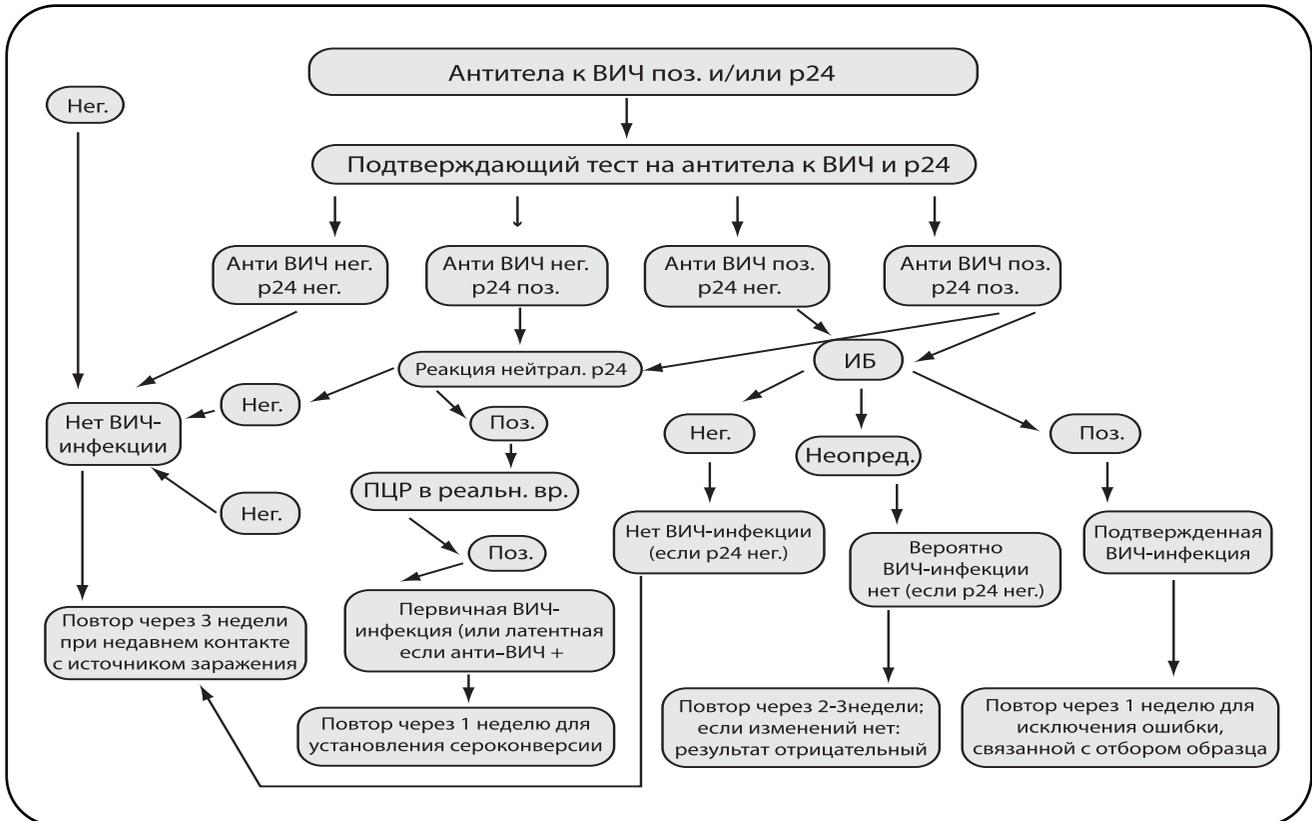


Рис. Алгоритм подтверждения результатов тестов четвертого поколения.

#### Определение комплексов ВИЧ антиген-антитело: четвертое поколение тест-систем

Хотя эти тест-системы были выпущены более 7 лет назад и внедрены в рутинную лабораторную практику по всему миру (кроме США), они не являются общепринятыми методами при скрининге донорской крови. Однако они заменяют NAT-тестирование в странах с ограниченными финансовыми ресурсами. Комплексные анализы позволяют улучшить раннюю диагностику ВИЧ-инфекции с помощью определения антигена с более или менее одинаковыми техническими нагрузками при небольшом увеличении стоимости процедуры, по сравнению с тестированием на антитела к ВИЧ с использованием тест-систем ИФА третьего поколения. В следующем разделе представлен обзор возможностей новых методов в отношении диагностического окна, атипичных сероконверсий, генетического разнообразия и специфичности.

#### Сокращение диагностического окна

С 1997г. в Европе запатентовано более 10 различных тест-систем четвертого поколения. Примерно треть твердой фазы

в этих тестах занята моноклональными антителами для определения антигена р24 ВИЧ. Остающаяся свободной связывающая поверхность может быть использована для определения антител ("сэндвич" или непрямой ИФА).

Первые тесты, ставшие доступными на международном рынке, показали сокращение диагностического окна в среднем до 4-5 дней по сравнению с анализом на антитела (Gurtler L, 1998; Weber W, 1998). Однако эти ранние тесты четвертого поколения имели низкую чувствительность обнаружения антигена ВИЧ р24 - менее 30пг/мл. По этой причине они не могли заменить серийно выпускаемые ИФА (чувствительность - 3-5 пг/мл) (Laperche S, 2000; Weber W, 1999).

С 2001г. выпускаются современные тест-системы четвертого поколения с улучшенной чувствительностью антигенной составляющей, соответствующей тестам для определения антигена. С 2004 года доступны автоматические тест-системы четвертого поколения, способные разделить реактивность на антигены и антитела и предоставить отдельные результаты (Weber W, 2005). Для всех остальных коммерческих тест-систем четвертого поколения разграничение реактивности между антигенами и антителами невозможно с технической точки зрения.

## Влияние генетического многообразия

Новые анализы с чувствительной антигенной составляющей продемонстрировали статистически значимое сокращение диагностического окна по сравнению с наиболее чувствительными тестами третьего поколения, доступными в настоящее время на международном рынке (Prism Anti-HIV-1/2 и Genscreen HIV-1/2 v.2). Для менее чувствительных ранних тест-систем четвертого поколения разница в чувствительности по сравнению с тест-системами третьего поколения была не всегда значимой. Разница определяется не только чувствительностью в определении антигена, но и выбором сероконверсионных панелей, особенно если тестируется относительно небольшое количество. Временная задержка между определением антигенов и антител значительно влияет на конечный результат. Например, если протестировано большое количество панелей с сопутствующими проявлениями антигенов и антител в первом образце, то разница в проявлении между третьим и четвертым поколениями тестов может быть преуменьшена. Для предотвращения потенциальной статистической ошибки для анализа использованы относительно большие базы данных.

## Второе диагностическое окно

Поскольку практически одна треть связывающей способности твердой фазы не доступна для определения антител, при использовании тест-систем четвертого поколения существует риск второго диагностического окна в переходную стадию между падением уровня антигена p24 и началом сероконверсии. В редких случаях антительная активность настолько мала, что измеренный уровень абсорбции лежит в области пороговых значений или ниже порога обнаружения. Meier T и соавт. (2001) описали случай острого ретровирусного синдрома, при котором тест-системы четвертого поколения установили первичную ВИЧ-инфекцию (11 дней) раньше (на 2 день после появления симптомов), чем тест-системы третьего поколения. Однако через 8 дней было установлено наличие второго диагностического окна. Это второе диагностическое окно было вызвано отсутствием ВИЧ-специфичных антител и снижением концентрации антигена p24 ниже порога обнаружения для тест-систем четвертого поколения. При дальнейшем наблюдении в соответствии с первым положительным результатом тест-системы третьего поколения на антитела был снова зарегистрирован положительный сигнал при помощи тест-системы четвертого поколения на 13 день после появления симптомов.

Аликвотные пробы четырех образцов, полученные на 8-11 день после появления симптомов (рассмотренный случай первичной ВИЧ-инфекции) были ретроспективно протестированы с помощью двух тест-систем четвертого поколения (чувствительность антигенной составляющей - антигена p24—3-5 пг/мл, что близко к чувствительности анализов только на антиген). При помощи этих тест-систем второе диагностическое окно не наблюдалось; однако было продемонстрировано снижение индекса величин параллельно с падением концентрации антигена p24 ВИЧ с 56 до 10 пг/мл (на дни 8 и 11, соответственно). Таким образом, чувствительность антигенной составляющей теста является критическим показателем для исключения ложноотрицательных результатов в период второго диагностического окна при первичной ВИЧ-инфекции.

К настоящему моменту влияние генетического многообразия на чувствительность серологической диагностики ВИЧ-инфекции недостаточно изучено (Apetrei C, 1996; Weber W, 2003). Получить сероконверсионные образцы с ВИЧ-1 не В субтипов сложно, поэтому активное изучение чувствительности вновь разработанных тест-систем также осложняется. В качестве замены сероконверсионных панелей для оценки чувствительности антиген-определяющей компоненты тест-систем четвертого поколения используются серии разведений вирусных лизатов различных групп и субтипов (Weber W, 2002). Исследования трех случаев первичной инфекции ВИЧ-1 циркулирующей рекомбинантной формы A0 1\_АЕ (ранее классифицированный как субтип E), продемонстрировали, что тест-системы четвертого поколения по сравнению с тест-системами третьего поколения сократили диагностическое окно в случае первичной инфекции ВИЧ-1 субтипа E. Самая чувствительная тест-система четвертого поколения обнаружила инфекцию ВИЧ-1 на 11 дней раньше, чем 5 тест-систем третьего поколения на антитела. Параллельно результатам, зарегистрированным для коммерчески доступных сероконверсионных панелей на ВИЧ-1 субтипа В, системы с наиболее чувствительной антигенной компонентой демонстрируют наибольшее сокращение диагностического окна по сравнению с NAT - тестами на ВИЧ. Поскольку генетические отличия антигена p24 между субтипами ВИЧ-1 незначительны, предполагается, что тест-системы четвертого поколения с высокочувствительной антигенной компонентой улучшают раннюю диагностику ВИЧ-инфекции независимо от многообразия штаммов. Эти тест-системы также наилучшим образом проявили себя при работе с сериями вирусных лизатов группы M, группы O и ВИЧ-2 (Weber W, 2003). Разница в чувствительности антигенной составляющей в отношении субтипов ВИЧ-1, которая наблюдалась в различных исследованиях (Weber W, 2002; Ly TD, 2001; Sickinger E, 2004), скорее всего, зависит от общего порога обнаружения, чем от генетического разнообразия штаммов ВИЧ-1.

## Атипичная сероконверсия

Крайне редко, при атипичном ходе сероконверсии раньше, чем может быть обнаружен антиген p24, первичная инфекция определяется в тест-системах ИФА третьего поколения раньше, чем выявление p24 в комбинированных тестах. Это связано с большей чувствительностью тестов на антитела (Weber W, 2002).

## Специфичность

В случае комбинированных анализов риск возникновения перекрестных реакций потенциально выше, чем при проведении анализов отдельно на антигены или антитела, поскольку оба серологических маркера представлены в одном тестируемом образце. Специфичность ранних тест-систем четвертого поколения составила 99,5-99,6%, то есть ниже, чем тест-систем третьего поколения (Ly TD, 2000; Gurtler L, 1998; Weber W, 1998). Высокий процент ложноположительных результатов при комбинированных

анализах мог весьма негативно сказаться на работе лабораторий с высокой пропускной способностью и при отборе безвозмездных доноров крови на территориях с низкой заболеваемостью. Отрицательная сторона связана с тем, что подтверждающий анализ (Вестерн-блот) на антитела должен сопровождаться отдельным определением антигенов. Проблемы низкой специфичности были разрешены с разработкой тест-систем после 2001г. Крупные исследования, проведенные с участием большого количества доноров крови, госпитализированных пациентов и потенциально зараженных образцов сыворотки ( $n > 10\ 000$ ), продемонстрировали, что специфичность тест-систем эквивалентна, а в некоторых случаях, даже выше, чем специфичность тест-систем третьего поколения (Weber B, 2002; Sickinger E, 2004).

### Роль тест-систем четвертого поколения для скрининга донорской крови и лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции.

Один из важных вопросов - возможность использования тест-систем четвертого поколения при скрининге донорской крови. Комбинированные анализы могут представлять значительный интерес для стран с низким доходом, которые не могут себе позволить NAT -тесты. Тест-системы четвертого поколения просты в исполнении, стабильны и затратно-эффективны (стоимость лишь немного выше стоимости отдельных анализов на антитела), с низким уровнем ложноположительных результатов (сравнимым с таковым для анализов третьего поколения). В странах с высоким доходом NAT-тесты возможно заменят тесты на антиген ВИЧ-1 при скрининге донорской крови и, следовательно, потребность в этих новых анализах будет меньше. Тест-системы четвертого поколения являются более затратно-эффективной альтернативой тест-системам на антигены и антитела ВИЧ для рутинной диагностики, особенно в урбанизированных центрах с высоким уровнем распространения ВИЧ (Ly TD, 2000).

### Комментарии экспертов и пятилетний обзор

В будущем NAT -тесты должны стать мультиплексными на ВИЧ и ВГС, полностью автоматизированными и обладать высокой производительностью при тестировании индивидуальных образцов и минипулов (8-24 образца). Существует потребность в уменьшении стоимости реагентов для увеличения затратно-эффективности, которая пока еще мала. Вопрос о включении NAT-теста на ВГВ в процедуру скрининга донорской крови обсуждается. Если будет принято решение о включении анализа на ДНК ВГВ в процедуру скрининга, то единственным путем для сокращения диагностического окна станет скрининг индивидуальных донаций или минипулов (не более 8 образцов) с использованием высокочувствительной NAT-системы. Поскольку генетическое многообразие ВИЧ быстро растет, производители и потребители NAT-тестов должны оценить эффективность анализов в отношении большого количества субтипов ВИЧ-1 и циркулирующих рекомбинантных форм, которые отражают эпидемиологически значимые циркулирующие штаммы по всему миру или в регионе, где будет проводиться этот скрининг. Методы определения ВИЧ-2 также должны быть включены в NAT -тестирование,

особенно в тех регионах, где данный тип вируса представлен.

Хотя некоторые европейские производители прекратили выпуск тест-систем третьего поколения, заменив их утвержденными чувствительными и специфичными тест-системами четвертого поколения, эти комбинированные тесты, возможно, не составят альтернативы NAT-тестам в странах с высоким доходом. Диагностическая индустрия начала развивать это новое поколение тест-систем и, когда NAT -тесты стали практически основным инструментом для скрининга донорской крови. Относительно слабая специфичность и чувствительность первых коммерчески доступных тест-систем четвертого поколения были впоследствии использованы в качестве аргументов против их использования для скрининга донорской крови. В клинических лабораториях ситуация будет другой. Можно ожидать, что тест-системы четвертого поколения заменят тест-системы третьего поколения в следующие пять лет (даже в США, поскольку они одобрены FDA) в связи с растущей очевидностью их важности для скрининга населения в целом и представителей группы риска (Anderson S, 2004; McElborough D, 2004; Brust S, 2000; LyTD, 2004; Saville RD, 2001; Bourlet T, 2005). Альтернативой может стать использование для скрининга ВИЧ-инфекции двух видов тест-систем - четвертого и третьего поколения. Преимуществом данной стратегии будет исключение второго диагностического окна и снижение потенциального риска получения ложнонегативных результатов, вследствие генетического многообразия ВИЧ.

Дальнейшего улучшения чувствительности при выявления антигена, возможно, не произойдет по причине технических ограничений. Однако выясняется возможность снижения нижнего предела обнаружения антигена р24 с 10 пг/мл до 0,5 нг/мл посредством предварительной температурной диссоциации иммунных комплексов (Sutthent R, 2003). По-прежнему существует некоторый потенциал для улучшения специфичности тест-систем четвертого поколения. Так же, как и для тестов NAT, для ИФА тест-систем четвертого поколения необходима оценка чувствительности выявления субтипов ВИЧ, CRF и ВИЧ-2, особенно, если эти тесты используются в качестве самостоятельных для скрининга донорской крови в странах с ограниченными финансовыми возможностями.

Следует рекомендовать тестирование на ВИЧ-инфекцию при помощи тест-систем четвертого поколения в любой клинической ситуации, включая обследование на ВИЧ перед хирургическим вмешательством, исключение ВИЧ-инфекции у пациентов с ИППП, обследование представителей группы риска, при подозрении первичной инфекции или наличии острого ретровирусного синдрома, а также в случае профессионального или непрофессионального контакта. В комплексе с тест-системами четвертого поколения может использоваться низкочувствительные ИФА тест-системы второго поколения для разграничения недавних и хронических инфекций. В условиях стационара стандартное тестирование на ВИЧ и получение результата может занять более 24 часов. Пока врач выясняет ВИЧ-статус пациента, очень часто пациент может быть уже выписан. В некоторых случаях пациенты так и не узнают свой ВИЧ-статус. Быстрое тестирование на ВИЧ способствует своевременному оказанию медицинской помощи и принятию профилактических мер. Поэтому рекомендуется

использование быстрых тестов четвертого поколения, время анализа которых менее 40 минут. Таким образом, отрицательный результат может быть получен в течение нескольких часов после забора крови. Повторно позитивные образцы следует как можно быстрее подтвердить в соответствии с алгоритмом, представленным на рисунке.

### Ключевые вопросы

- Основная причина получения ложноотрицательных результатов при молекулярных и серологических скрининговых исследованиях на ВИЧ - наличие диагностического окна до начала фазы сероконверсии. Другие менее важные факторы - генетическое многообразие, атипичная сероконверсия, отсроченный иммунный ответ или его отсутствие при поздних стадиях болезни, а также лабораторные ошибки.
- По результатам американских и общенациональных европейских исследований установлено, что тесты на основе амплификации нуклеиновых кислот (NAT) позволяют снизить остаточный риск практически на 50%.
- В странах центральной Европы скрининговые NAT-анализы на ВИЧ стали обязательными; несмотря на это их затратно-эффективность остается достаточно низкой.
- Будущее NAT -тестов за мультиплексными полностью автоматизированными тест-системами на ВИЧ, ВГС (ВГВ) с большой пропускной способностью при тестировании индивидуальных донаций или минипулов.
- Комбинированные тест-системы четвертого поколения достигли высоких уровней чувствительности и специфичности. Тест-системы с высокой чувствительностью выявления антигена (порог обнаружения р24 менее 5 пг/мл) могут использоваться вместо тест-систем для выявления только антигена.
- В следующие пять лет тест-системы четвертого поколения заменят тест-системы третьего поколения в диагностических лабораториях (даже в США, так как они одобрены FDA), поскольку важность их использования при скрининге населения с низким и высоким риском заражения ВИЧ становится все более очевидной.
- Тест-системы четвертого поколения требуют специального алгоритма подтверждения результатов, который включает качественный анализ на антиген ВИЧ, NAT-тест и Вестерн-блот (см рис.)
- Последние тест-системы четвертого поколения демонстрируют высокую стабильность и затратно-эффективность (стоимость лишь немного превышает стоимость анализов на антитела) и низкий уровень ложноположительных результатов (сравним с тестами третьего поколения).
- Тест-системы четвертого поколения, возможно, не станут альтернативой тестам NAT в развитых странах. Однако в регионах с высокой заболеваемостью ВИЧ-инфекцией, но в которых NAT-тестирование при скрининге донорской крови недоступно вследствие ограниченных финансовых ресурсов, тест-системы четвертого поколения могут способствовать улучшению безопасности донаций по приемлемым ценам.

## ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ:

**ДС-ИФА-АНТИ-ВИЧ-УНИФ**

**ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН**

**ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ-ДИФ**

**ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ**

**ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН**

**ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ-СПЕКТР**

**ВЛК-ВИЧ Ag (p24)**

Образец для внутрилабораторного контроля качества

**ВЛК-АНТИ-ВИЧ-1**

Образец для внутрилабораторного контроля качества

## Бактериальные инфекции

### 13/402 Связь вспышек внутрибольничной (госпитальной) бактериемии в отделении интенсивной терапии новорожденных с *Acinetobacter septicus sp. nov.*

*Acinetobacter septicus sp. nov.* association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit.

A. Kilic , H. Li , A. Mellmann , A.C. Basustaoglu , M. Kul , Z. Senses , H. Aydogan , C.W. Stratton , D. Harmsen , Y.W. Tang  
J Clin Microbiol., 2008; 46(3):902-908

PMID: 18160455

PMCID: PMC 2268383

Роль бактерий рода *Acinetobacter sp.*, кроме *Acinetobacter baumannii* в развитии вспышек внутрибольничной бактериемии изучена недостаточно. В одной из клиник Турции, у пяти пациентов отделения интенсивной терапии новорожденных в течение одной недели с периферических венозных катетеров были выделены семь изолятов, принадлежащих к роду *Acinetobacter*. Всем пяти пациентам были установлены катетеры центральной вены, через которые они получали полное парентеральное питание, после чего у них появились симптомы бактериемии. Двое из пяти пациентов умерли. Аппараты для аэрации, образцы инфузионных растворов для внутривенных вливаний, пробы водопроводной воды, смывы с различных поверхностей и рук персонала были исследованы на бактериальную обсемененность. Все семь изолятов показали сходные данные по результатам исследования биохимической активности, чувствительности к антибиотикам и при проведении гель-электрофореза в импульсном поле, что свидетельствовало об их принадлежности к единому клону. Для идентификации этих изолятов использовали стандартный набор биохимических тестов и три коммерческие тест-системы. Фенотипически изоляты отличались от *Acinetobacter ursingii* по наличию гемолиза на агаре с кровью барана и по отсутствию признака утилизации цитрата натрия. У одного выделенного изолята были определены последовательности гена РНК 16S рибосомы, содержащего как минимум три полиморфные копии между 70 и 206 нуклеотидными позициями. Проводилось полное сравнение последовательности гена 16S рРНК (1.529 и 1.531 п.н.) и фрагмента 801 п.н. гена *groB*, в первом случае выявлено сходство изолята с *A. ursingii* с вероятностью 99,5%, во втором - 97,2%. ДНК-ДНК сходство выделенного штамма и типового штамма *A. ursingii* составило 64,7 и 68,7%, что было ниже рекомендуемого порогового значения в 70% для определения бактериальных видов. Эта величина показывает, что данный изолят *Acinetobacter* явился причиной вспышки внутрибольничной бактериемии в отделении интенсивной терапии новорожденных. Было предложено назвать данную группу изолятов *Acinetobacter septicus sp. nov.*, а изученный изолят обозначить АК001.

### 14/403 Бактериологические и эпидемиологические характеристики случаев дифтерии в Дели и окрестностях - ретроспективное исследование.

Bacteriological and epidemiological characteristics of diphtheria cases in around Delhi -a retrospective study. N.C. Sharma , J.N. Banavaliker , R. Ranjan , R.Kumar  
Indian J Med Res., 2007; 126(6):545-552  
PMID: 18219082

**Цель исследования.** Дифтерия, вызываемая различными токсигенными биотипами *Corynebacterium diphtheriae*, эндемична в Дели. Информация о биохимической идентификации, токсигенности и чувствительности к антибиотикам биотипов недостаточна. Проведено ретроспективное исследование по идентификации коринебактерий по биохимическим и токсигенным свойствам, определению чувствительности к антибиотикам, а также изучению некоторых эпидемиологических характеристик случаев заболевания дифтерией в Дели и соседних штатах в период с 1998-2004гг.

**Методы.** В целом, патогенные коринебактерии определяли в 1118 смывах со слизистой глотки и 585 смывах со слизистой носовой полости. Для определения токсигенности, проведения скрининга и изучения антибиотикограммы изолятов были использованы методы, рекомендованные ВОЗ.

**Результаты.** В 493 (44,1%) случаях получены положительные результаты исследований; в 71,8% диагностирована фарингеальная форма дифтерии, в 20,9% - назофарингеальная и в 7,3% случаев - назальная форма. Биохимическая идентификация позволила выявить два вида коринебактерий—*C. diphtheriae* и *C. pseudodiphtheriticum*. Выявлены три биотипа *C. diphtheriae*: *intermedius* (95,5%), *gravis* (3,4%) и *mitis* (1,1%). Токсин был выявлен у 96% изолятов *C. diphtheriae*. Случаи заболевания дифтерией были зарегистрированы в Дели и четырех близлежащих штатах. Соотношение лиц мужского и женского пола составило 1,6:1. Среди заболевших преобладали дети младше 9 лет (93,3%), преимущественно невакцинированные (70,2%). Более высокие показатели смертности зарегистрированы в Дели (16,8%), несколько ниже - в Уттар Прадеш (14,6%) и Харияне (5,9%).

**Выводы.** Стандартными методами выявлено вытеснение серовара *mitis C. diphtheriae* сероваром *intermedius*, а также случаи инфекции, вызванной другими патогенными коринебактериями. Для проведения регулярного мониторинга в эндемичных областях важное значение имеет хорошее оснащение бактериологических лабораторий. Это позволит контролировать распространение инфекции.

### 15/404 Бактерии *Burkholderia cepacia complex*: особенности естественной биологии.

*Burkholderia cepacia complex* bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. E. Mahenthiralingam , A. Baldwin , C.G. Dowson  
J Appl Microbiol., 2008, 24  
PMID: 18217926

Растения, их корни и листья образуют естественную среду обитания для широкого круга грамотрицательных бактерий, таких как *Burkholderia*, *Pseudomonas* и *Ralstonia*. При этом многие из этих бактерий оказывают благо-

творное влияние на растение, ускоряют процессы разложения загрязняющих веществ и повышают урожайность культурных растений. С другой стороны, эти виды бактерий могут быть возбудителями оппортунистических инфекций у восприимчивых людей, особенно у лиц, страдающих муковисцидозом (кистозным фиброзом). В настоящей статье рассматривается современное понимание бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* (*Vcc*) как группы типичных оппортунистических патогенов; сравнивается их роль в клинической эпидемиологии и в экологических процессах.

В настоящее время комплекс *B. cepacia* включает девять видов микроорганизмов, которые сложно идентифицировать по фенотипическим признакам. Среди генетических методов видовой идентификации *Vcc* доказана эффективность анализа последовательностей генов *16S rRNA* и *recA*. Использование мультилокусного сиквенсирования (MLST) также является полезным инструментом для идентификации штаммов и видов *Vcc*. Исторически сложилось так, что бактерии вида *Burkholderia cepaciosa* являлись доминирующим патогеном при развитии инфекций у больных муковисцидозом, однако внедрение системы строгого инфекционного контроля привело к снижению распространенности данного вида. В настоящее время в Великобритании наиболее распространенным патогеном из группы *Vcc* среди лиц, страдающих муковисцидозом, является *Burkholderia multivorans*; аналогичное изменение эпидемиологии наблюдается и среди больных муковисцидозом в США. Распространение видов *Vcc*, обитающих в природной среде, может существенно варьировать в зависимости от типа среды. Было установлено, что клонально-родственные штаммы *Vcc*, встречающиеся в природной среде, могут стать причиной инфекции. Несколько вспышек внутрибольничных инфекций было непосредственно связано с бактериальным загрязнением медицинского оборудования и инструментов, дезинфицирующих и лекарственных средств. За последние десять лет был достигнут значительный прогресс в понимании природы и патогенетических механизмов клинических инфекций, вызываемых данной группой бактерий.

#### 16/405 Характеристика клинических штаммов грамотрицательных облигатных анаэробов.

Characteristic of clinical strains of gram-negative obligate anaerobes.

J. Kadzielska, M. Kierzkowska, A. Sawicka-Grzelak, A. Rokosz, M. Luczak

Med Dosw Mikrobiol., 2007; 59(4):351-357

PMID: 18416127

Цель данного исследования - оценить распространенность и определить профиль чувствительности к антибиотикам грамотрицательных облигатных анаэробных бактерий, выделенных из клинического материала, полученного от пациентов, госпитализированных в 2005-2006гг. Биохимическую идентификацию и определение чувствительности к антибиотикам осуществляли с использованием полуавтоматического анализатора "ATB Expression" (bioMerieux, Франция). При исследовании 12262 образцов выделено 867 штаммов облигатных анаэробов, 138 штаммов (15,9%) строго анаэроб-

ных грамотрицательных бактерий. Все культуры выращивали на Columbia агаре и агаре Шедлера (bioMerieux) с добавлением 5% бараньей крови при 37°C в течение 48-120ч в 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Штаммы *Bacteroides spp.* были изолированы в 41,3% случаев. В этой группе оценивали β-лактамазную активность с использованием дисков с нитроцефином (Cefinase BBL, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, MD, США). Продукцию ESBLs (бета-лактамазы расширенного спектра действия) определяли при помощи двух диско-диффузионных методов: двух дисков синергического действия по Jarlier и соавт., и диагностических дисков по Appleton. Продукция ESBLs штаммами *Bacteroides spp.* была обнаружена в 5,3% случаев. У всех штаммов *Bacteroides spp.* минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) оценивали по градиенту диффузии при помощи E-тестов (выпускаемых AB BIO-DISK, Швеция). ESBLs и МИК изучали на питательной среде на основе агара Wilkins-Chalgren с добавлением 5% крови барана (Difco Lab., США); все чашки инкубировали при 35°C в течение 48 часов в 85%N<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Большинство штаммов грамотрицательных облигатных анаэробных бактерий, выделенных из клинического материала, оказались чувствительными к имипенему (100%), метронидазолу (99,3%) и β-лактамам антибиотикам с ингибиторами β-лактамазы: пипероциллин/тазобактам (99,3%), тикарциллин/клавуланат (99,3%), амоксициллин/клавуланат (99,7%).

#### 17/406 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: микробиология, биохимические характеристики, патогенез и молекулярное изучение вирулентности.

*Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence.

F.A. Dorella, L.G.Pacheco, S.C.Oliveira, A.Miyoshi, V.Azevedo

Vet Res., 2006; 37(2):201-218

PMID: 16472520

*Corynebacterium pseudotuberculosis* является этиологическим агентом, вызывающим казеозный лимфаденит - общее заболевание, распространенное в популяциях мелких жвачных животных по всему миру. Даже если заболевание выявлено, очень сложно его искоренить, так как лекарственная терапия неэффективна и клинические симптомы у инфицированных животных недостаточно выражены. В настоящей статье рассматриваются микробиологические особенности, биохимические свойства и таксономическое положение *C.pseudotuberculosis*; а также общие аспекты инфекции, основные факторы вирулентности и доступные в настоящее время коммерческие вакцины. Рассматриваются современные молекулярные методы для изучения новых факторов вирулентности *C.pseudotuberculosis* и генов, которые помогут лучше понять биологию этого микроорганизма. Эти знания могут также способствовать созданию более совершенных вакцин, в том числе субъединичных и ДНК-вакцин, что позволит улучшить диагностику, лечение и профилактику этого заболевания.

**18/407 Идентификация "Cronobacter" spp. (Enterobacter sakazakii).**

Identification of "Cronobacter" spp. (Enterobacter sakazakii).

C. Iversen , A. Lehner , N. Mullane , J. Marugg , S. Fanning , R. Stephan , H. Joosten  
J Clin Microbiol. 2007;45(11):3814-3816  
PMID: 17881547  
PMCID: PMC2168468

Согласно недавно предложенной таксономической классификации патоген неонатальных инфекций *Enterobacter sakazakii* должен включать пять видов внутри нового рода "*Cronobacter*". Правильная идентификация этих микроорганизмов имеет важное клиническое значение. При помощи надежных тестов для определения биохимической активности исследовали 312 штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе 210 штаммов "*Cronobacter*", результаты подтверждали генетическими методами детекции. Все изоляты "*Cronobacter*" оказались положительными по протоколам ПЦР-анализа *dnaG* и *gluA* и проявляли альфа-глюкозидазную активность. При помощи ID 32E v3.0 идентифицировали 99,5% изолятов "*Cronobacter*" (как наиболее близких к *E. sakazakii*).

**19/408 Идентификация анаэробных неспорообразующих грамположительных бацилл с помощью биохимических тестов и газожидкостной хроматографии.**

Identification of anaerobic nonsporeforming gram-positive bacilli by biochemical tests and gas-liquid chromatography.

P. Cauich-Sanchez , F. Alatrisme-Mondragon , E. Garcia-Cano , C. Aquino-Santiago  
Rev Latinoam Microbiol., 2001; 43(1):27-35  
PMID: 17061569

Существует много методов идентификации анаэробных неспорообразующих бацилл: гистологический, бактериологический (биохимические тесты, микротест-система API 20A), серологический, анализ состава клеточной стенки, молекулярные методы и метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). В настоящем исследовании для идентификации изучаемой группы микроорганизмов сравнивали результаты биохимических тестов и данные ГЖХ. Условия анализа ГЖХ подбирали с использованием референсных штаммов. В этих условиях анализировали десять штаммов, предварительно идентифицированных по результатам биохимических тестов. Для выращивания штаммов использовали PYG - бульон; в конечных продуктах ферментации определяли летучие и нелетучие жирные кислоты. Их качественный анализ был произведен при сравнении с хроматографическими профилями стандартных образцов и образцов референсных штаммов. Дополнительно был проведен полуколичественный анализ. Идентификация по биохимическим тестам дала следующие результаты: 5 штаммов принадлежали к роду *Actinomyces* genus; 3 штамма - к *Propionibacterium acnes*; 1 штамм - к *Propionibacterium granulorum* и 1 штамм - к *P. propionicum*. При помощи ГЖХ удалось идентифицировать только 7 штаммов: четыре принадлежали к роду *Actinomyces* и три - к *P. acnes*. Корреляция между результатами биохимических тестов и ГЖХ была выявлена при идентификации шести штаммов. Метод газожидкостной хроматографии наряду с другими дополнительными тестами может быть использован для окончательной видовой идентификации.

**20/409 Идентификация клинических штаммов коринеформных бактерий: сравнение биохимических методов и анализ последовательности генов rPHK 16S и rpoB.**

Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes.

E.E. Adderson , J.W. Boudreaux , J.R. Cummings , S. Pounds , D.A. Wilson , G.W. Procop , R.T. Hayden  
J Clin Microbiol., 2008;46(3):921-927  
PMID: 18160450  
PMCID: PMC2268328

В настоящем исследовании при идентификации коринеформных бактерий проведено сравнение диагностической эффективности трех коммерческих идентификационных тестов и трех тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот. Исследовали 50 различных изолятов, в том числе 12 изученных и охарактеризованных контрольных штаммов и 38 изолятов микроорганизмов, выделенных от пациентов отделения детской онкологии. В целом, от 33,3 до 75,0% контрольных штаммов были правильно идентифицированы до вида при помощи тест-систем для фенотипической идентификации или тестов для амплификации нуклеиновых кислот. Наиболее чувствительными оказались тест-система API Coryne и тест-система для амплификации и анализа нуклеотидных последовательностей гена rPHK 16S с использованием оптимизированных праймеров для коринеформных бактерий. При помощи этих тест-систем были правильно идентифицированы до вида 9 из 12 контрольных штаммов и, с высокой вероятностью, были правильно идентифицированы все изоляты. Организмы, идентифицированные неправильно, принадлежали к видам, не включенным в базу данных тестов, или не образовывали продуктов реакций, включенных в базу данных теста, или не могли быть дифференцированы с использованием биохимических профилей. Тесты, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, имеют ограниченные возможности для осуществления видовой идентификации некоторых бактерий, сравнение гомологичных последовательностей осложняется включением последовательностей аллельных генов, найденных в базе данных у не культивированных и не охарактеризованных штаммов. Использование rpoB генотипирования ограничено малым количеством репрезентативных последовательностей нуклеотидов гена, доступных для сравнения. Корреляция между идентификационными тест-системами была низкой, особенно при исследовании клинических изолятов.

**21/410 Идентификация индол-положительных и индол-отрицательных клинических штаммов Klebsiella spp.**

Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative Klebsiella spp.

M.S. Alves , R.C. Dias , A.C. de Castro , L.W. Riley , V.M. Moreira  
J Clin Microbiol., 2006;44(10):3640-3646  
PMID: 16928968  
PMCID: PMC1594763

Биохимические методы, используемые для видовой идентификации бактерий, имеют определенные ограниче-

ния; возможно, этим и объясняется сложность при определении таксономического положения представителей рода *Klebsiella*. Цель настоящего исследования - изучение диагностической ценности простой панели биохимических тестов для классификации коллекции штаммов клебсиелл, выделенных от людей. Авторы исследования установили, что определение видовой принадлежности большинства штаммов возможно только при введении трех дополнительных тестов. В качестве референс-теста был использован анализ фрагмента гена *groV* (512 пн). В общей сложности, 16 стандартных и 4 дополнительных теста были использованы для оценки 122 свежеевыделенных изолятов (идентифицированных как *Klebsiella*). Штаммы были выделены в клинической лаборатории университетского госпиталя (штат Минас-Жерайс, Бразилия) от 120 пациентов. Из них 102 (84%) изолята были идентифицированы как *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella variicola*, 19 (15%) как *Klebsiella oxytoca*, и 1 (1%) как *Raoultella planticola*. ПЦР-типирование выявило многообразие генотипов. Результаты секвенирования *groV* гена подтвердили результаты фенотипической идентификации, было выявлено пять штаммов *K. variicola* из группы *K. pneumoniae/K. variicola*. Три дополнительных теста (рост при температуре 10°C, ассимиляция гистамина и d-меллитозы) должны рассматриваться в качестве основных при проведении типирования клебсиелл.

#### 22/411 Множественная лекарственная устойчивость микроорганизмов, формирующих биопленки, и персистирующих клеток.

Multidrug tolerance of biofilms and persister cells.

K. Lewis

Curr Top Microbiol Immunol., 2008; 322:107-131

PMID: 18453274

Бактериальные популяции продуцируют небольшое количество "дремлющих" (персистирующих) клеток, которые проявляют множественную лекарственную толерантность. Все механизмы резистентности микроорганизмов, работают одинаково: предотвращают попадание антибиотика в цель. Механизмы толерантности, напротив, работают по принципу отключения мишеней. Антибиотики бактерицидного действия убивают бактерии, повреждая их мишени, а не ингибируют их. Отключение мишеней защищает их от гибели. Количество персистирующих клеток в растущей популяции бактерий увеличивается к середине фазы логарифмического роста и достигает максимума приблизительно 1% в стационарной фазе. Подобным образом медленно растущие микробные биопленки производят значительное количество персистирующих клеток. Способность биопленок ограничивать доступ со стороны компонентов иммунной системы, и способность персистирующих клеток защищаться от воздействия антибиотиков могут вносить вклад в понимание устойчивости штаммов *in vivo* и развития реинфекции. Изоляция персистирующих клеток *E. coli* осуществляется выделением GFP клеток с ослабленной трансляцией и позволяет получать профиль экспрессии гена. Этот профиль свидетельствует о нисходящих путях регуляции биосинтеза, что согласуется с их "дремлющей" природой и выявляет сверхэкспрессию токсин/антитоксин модулей. Стохастическая сверхэкспрессия токсин, которые ингибируют такие важные функции, как трансляция, может вносить вклад в формирование перси-

стирующих клеток. Эктопическая экспрессия *RelE*, *MazF*, и *HipA* генов токсин, производит клетки с множественной лекарственной устойчивостью. Независимо от токсин/антитоксин модулей, были идентифицированы *glpD* и *plsB* как возможные гены сверхэкспрессии клонирования геномной библиотеки и отбора по толерантности к антибиотикам персистирующих клеток. Дрожжи *Candida albicans* способны вызывать инфекции, образуя биопленки, толерантные к антибиотикам, подобные бактериальным биопленкам. Биопленки *C. albicans* продуцируют персистирующие клетки с множественной лекарственной толерантностью, которые являются не столько мутантами, сколько фенотипическими вариантами дикого типа. Однако в отличие от бактериальных персистирующих клеток, персистирующие клетки *C. albicans* получены только в биопленке, но не в планктонной стационарной популяции. Идентификация генов персистенции открывает путь к разработке рационального метода лечения инфекций, вызываемых микроорганизмами, образующими биопленки. Сочетание традиционных антибиотиков со сложными ингибирующими агентами персистирующих клеток может способствовать разработке эффективного метода лечения. Другие подходы к решению проблемы - стерилизация, проантибиотики и циклическое применение традиционных антимикробных препаратов.

#### 23/412 Идентификация грамотрицательных бацилл непосредственно в пробирках с кровью.

Identification of Gram-negative bacilli directly from positive blood culture vials.

S.Y. Ng, L.L. Kwang, T.Y. Tan

J Med Microbiol., 2007;56(4):475-479

PMID: 17374886

Возможность быстрого получения результатов выявления возбудителей инфекции в крови имеет важное значение для своевременного предупреждения развития септицемии. В настоящем исследовании оценивали точность прямой инокуляции обсемененной крови (посев уколом) в пробирки со средами для биохимической идентификации представителей семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Acinetobacter*. Исследовали 181 образец; впоследствии 25% образцов были исключены из исследования из-за роста смешанных колоний. При помощи предложенного метода до вида были идентифицированы 133 (98%) изолята из 136; метод технически прост, для обработки положительных образцов дополнительно потребовалось три минуты. Результаты проведенного исследования показали, что метод прямой инокуляции исследуемой крови обеспечивает приемлемую видовую идентификацию грамотрицательных бацилл, расчетная (потенциальная) экономия времени составляет 24ч по сравнению с традиционными методами.

#### 24/413 Механизмы естественной и индуцированной резистентности бактериальных биопленок.

Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms.

G.G. Anderson, G.A. O'Toole

Curr Top Microbiol Immunol., 2008; 322:85-105

PMID: 18453273

Микроорганизмы в составе бактериальных биопленок

устойчивы к воздействию антибиотиков, что вызывает большие трудности при лечении инфекций, вызванных бактериями, формирующими биопленки. Генетические механизмы антибиотикорезистентности бактерий биопленок можно разделить на две категории: факторы естественной и факторы индуцированной резистентности. Механизмы естественной резистентности активизируются в процессе развития биопленки и являются важными структурными и физиологическими факторами. Механизмы естественной резистентности включают: пониженную скорость диффузии антибиотика через цитоплазматический матрикс бактерий биопленки, снижение поступления кислорода и питательных веществ, сопровождающееся изменением метаболической активности, формирование резистентных клеток и других специфических молекул. Индуцированные факторы резистентности запускаются

антибактериальными агентами. Антибиотикорезистентность бактерий биопленок, вероятнее всего, является проявлением как естественных, так и индуцированных механизмов. В настоящее время многие исследователи пытаются преодолеть эту высокую резистентность к антибиотикам у микроорганизмов, ассоциированных в биопленку, разрабатывая новые препараты, направленные на разрушение биопленки и уничтожение составляющих ее бактерий. Эти исследования привели к выявлению нескольких молекул, активно нарушающих физиологию бактерий биопленки, часто нарушая целостность клеточной стенки бактерий. Таким образом, воздействие на механизмы естественной и индуцированной резистентности является многообещающим для лечения инфекций, вызванных бактериями, формирующими биопленки.

## НАБОРЫ ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **ПБДЭ**

Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии. Предназначена для энзимоидентификации энтеробактерий по 20 биохимическим признакам.

**Время анализа** - 18-22 ч.

**Срок годности** - 12 мес.

**Каталожный номер** - 131

### **ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-12**

Набор реагентов для идентификации энтеробактерии по 12 биохимическим признакам до вида. Выпускается в комплекте из 3-х неразборных планшетов с возможностью 3-х кратного использования на протяжении срока годности.

**Время анализа** - 18-24 ч.

**Срок годности** - 6 мес.

**Каталожный номер** - 731

### **ДС-ДИФ-САЛЬМОНЕЛЛА**

Набор реагентов для идентификации и межвидовой дифференциации микроорганизмов рода *Salmonella* по 8 биохимическим тестам.

**Время анализа** - 16-20 ч.

**Срок годности** - 6 мес.

**Каталожный номер** - 1431

### **ПБДС**

Пластина биохимическая, дифференцирующая стафилококки. Предназначена для энзимоидентификации стафилококков по 17 биохимическим признакам.

**Время анализа** - 18-22 ч.

**Срок годности** - 12 мес.

**Каталожный номер** - 1431

### **ДС-ДИФ-КОРИНЕ**

Набор реагентов для дифференциации микроорганизмов рода *Corynebacterium* до вида по 9-ти биохимическим признакам и определения токсигенных свойств.

**Время анализа** - 16-24 ч.

**Токсигенные свойства** - 48 ч.

**Срок годности** - 6 мес.

**Каталожный номер** - 1031

### **Программное обеспечение для автоматизированной идентификации бактерий**

Программное обеспечение предназначено для компьютерной интерпретации результатов биохимического тестирования штаммов микроорганизмов разных таксономических групп (энтеробактерий, стафилококков, коринебактерий, неферментирующих бактерий, сальмонелл).

**Каталожный номер** - 1131

## Лабораторная диагностика неинфекционных заболеваний

## Лабораторная диагностика патологии щитовидной железы

**25/414 Алгоритм определения гормонов тиреоидной группы: результаты пилотного исследования.**

A thyroid testing algorithm: results of a pilot study.  
Henry Ford Hosp Med J., 1991; 39(1): 30-34  
H. Ibrahim, M.J. McKenna, C.S. Feldkamp  
PMID: 1856099

Авторы настоящего исследования создали диагностический алгоритм для оценки функции щитовидной железы (ЩЖ). В соответствии с ним при подозрении на патологию ЩЖ первым исследуют уровень тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови. Его определение основано на том, что нормальный уровень ТТГ отражает нормальную функцию ЩЖ (за исключением очень редких случаев), поэтому определения других диагностических маркеров не требуется. С другой стороны, пониженный или повышенный уровень ТТГ может свидетельствовать о тиреоидной патологии. В этом случае показаны дополнительные тесты для прояснения клинической ситуации, постановки корректного диагноза и назначения терапии. Компьютеризированная версия данного диагностического алгоритма автоматически определяет необходимость дальнейшего назначения исследования на Т4, Т3-uptake и определения индекса свободного тироксина (FT4I).

Проводили пилотное исследование для оценки алгоритма исследования функции ЩЖ, включающее определение уровня ТТГ в сыворотке крови при помощи чувствительного иммунорадиометрического анализа (ИРМА), сопровождающееся компьютерным заключением УЗИ, на основании результатов которых принимали решение о проведении дополнительных исследований. В исследовании приняли участие 216 амбулаторных пациентов, которые были разделены на следующие группы (в зависимости от уровня ТТГ в сыворотке крови): группа I—с подавленным уровнем ТТГ (менее 0,1 мМЕ/л); группа II—с низким уровнем ТТГ (от 0,1 до 0,4 мМЕ/л); группа III—с нормальным уровнем ТТГ (от 0,5 до 5,0 мМЕ/л); группа IV—с повышенным уровнем ТТГ (выше 5,0 мМЕ/л). У 151 (69,9%) из 216 пациентов определены нормальные значения уровня ТТГ, у 20 пациентов (9,3%) уровень ТТГ был менее 0,1 мМЕ/л (группа I), у 30 пациентов (13,9%) — от 0,1 до 0,4 мМЕ/л (группа II) и у 15 пациентов—более 5 мМЕ/л (группа IV).

Определение уровня тироксина (Т4), Т3-uptake и FT4I в группах I, II и IV показало, что уровень Т4 и Т3-uptake были нормальными для большинства пациентов во всех группах, показатель FT4I был нормальным у 80% пациентов I группы: 93,4% пациентов II группы и 93,3% пациентов III группы. У всех пациентов I группы диагностирован гипертиреоз экзогенного или эндогенного происхождения. У всех пациентов II группы (за исключением одного) клинически определено эутиреоидное состояние, 50% пациентов принимали либо L-тироксин, либо пропилтиоурацил и у 50% пациентов не обнаружено патологии щитовидной железы.

У пациентов IV группы выявлен гипотиреоз. В целом, определение уровня ТТГ оказалось более информативным при проведении диагностики гипертиреоза и гипотиреоза, чем определение уровня Т4 и Т3-uptake или в комбинации с FT4I; полученные результаты исследований находились в пределах нормального диапазона значений для большинства пациентов во всех группах.

**26/415 Наиболее приемлемый алгоритм исследования функции щитовидной железы в диагностике гипертиреоза у пациентов в Таиланде.**

A more appropriate algorithm of thyroid function test in diagnosis of hyperthyroidism for Thai patients.  
T. Snabboon, V. Sridama, S. Sunthornyothin, S. Suwanwalaikorn, V. Vongthavaravat  
J Med Assoc Thai., 2004;87(2): 19-21  
PMID:16083155

Лабораторное исследование тиреоидной функции является важным инструментом в диагностике дисфункции щитовидной железы. В настоящее время, все еще остается неясным, какой диагностический алгоритм является наиболее оптимальным при обследовании пациентов с гипертиреозом.

**Цель исследования.** Сравнение различных алгоритмов диагностики гипертиреоза.

**Методы.** У пациентов с эндокринной патологией, находящихся на лечении в королевском госпитале г. Чулалонгкорна (Таиланд), определяли содержание в сыворотке крови ТТГ, общего и свободного Т3 и Т4. Диагноз гипертиреоза выставляли на основании повышенного уровня свободного Т3 (или свободного Т4) в сочетании с подавленным уровнем ТТГ. Авторы исследования сравнивали чувствительность, специфичность, прогностическую ценность различных алгоритмов диагностики гипертиреоза.

**Результаты.** Из 452 пациентов, принявших участие в данном исследовании, 94,24% составляли женщины. У 206 пациентов диагностирован гипертиреоз, у 30 — субклинический гипертиреоз, у 1 — субклинический гипотиреоз, у 8 — первичный гипотиреоз и у 207 пациентов гормональные показатели были в пределах нормы. У 16,02% пациентов имел место «Т3-токсикоз», в то время как «Т4-токсикоз» выявлен у 2,16% пациентов. Анализ эффективности оцениваемых алгоритмов показал, что определение ТТГ и свободного Т3 является наиболее оптимальным алгоритмом исследования с чувствительностью 97,57% и специфичностью 100%, по сравнению с алгоритмом определения свободного Т4 и ТТГ с чувствительностью 83,98% и специфичностью 100%.

**Выводы.** На основании данных о высоком уровне «Т3-токсикоза» в настоящем исследовании, определение уровня ТТГ и свободного Т3 должно быть признано приоритетным в диагностике гипертиреоза, уровень свободного Т4 необходимо определять в случае подозрения на Т4-токсикоз.

### 27/416 Исследование функции щитовидной железы по уровню тиреотропного гормона: оценка надежности алгоритма.

Thyroid function testing based on assay of thyroid-stimulating hormone: assessing an algorithm's reliability. R.X. Davey, M.I. Clarke, A.R. Webster. Med J Aust., 1996 18; 164(6):329-332. PMID: 8606655

**Цель исследования.** Оценка алгоритма исследования функции щитовидной железы (ЩЖ) по уровню ТТГ у пациентов с нормальной функцией ЩЖ (эутиреоз) при наличии или отсутствии факторов, влияющих на тиреоидную функцию.

**Дизайн исследования.** Австралийская комиссия по медицинскому страхованию (Australian Health Insurance Commission, AHIC) установила категории больных, для которых государственная страховая компания оплачивает исследования по определению уровня ТТГ и свободного Т4 (Т4св.). Однако при исследовании тиреоидной функции у некоторых других категорий пациентов оплачивался только анализ крови на ТТГ. Проведено проспективное исследование результатов 1000 анализов параллельного определения уровня ТТГ и Т4св. у пациентов из установленной категории. Оценивали надежность определения повышенного или пониженного уровня ТТГ (используемого в качестве первичного скринингового теста при подозрении на заболевание ЩЖ) при сравнении с показателями уровня Т4 св. (нормализующимися при эутиреозе). Необходимо было выяснить, является ли предложенный алгоритм тестирования эффективным в тех случаях, когда уровень Т4св. отклонен от нормы, а уровень ТТГ имеет нормальную величину.

**Результаты.** Недостоверные результаты исследований, полученные при использовании алгоритма в целом у всех категорий пациентов, также как и у пациентов, не относящихся к категориям установленным AHIC, наблюдались в 2,7% случаев; не выявлено статистически достоверной разницы в ненадежности алгоритма у пациентов, относящихся к различным категориям.

Ненадежность алгоритма среди разных групп пациентов составила: у пациентов с подозрением на наличие заболеваний щитовидной железы - 3,4%; у пациентов с синдромом "эутиреоидной слабости" - 0%; у пациентов с психозами или деменцией - 1,1%; у пациентов, принимающих лекарственные препараты, влияющие на функцию щитовидной железы - 2,1% и у пациентов с гипоталамо-гипофизарной дисфункцией - в одном случае из шести. Диапазон значений уровня Т4св. при неэффективном алгоритме исследования составлял 6,4-29,5 пмол/л у пациентов без тиреоидной патологии и 3,4-27,4 пмол/л - у пациентов с заболеваниями щитовидной железы. У пациентов с подозрением на патологию щитовидной железы, доля результатов анализов только с отклоненным от нормы уровнем ТТГ была значительной ( $p < 0,001$ ).

**Выводы.** Было показано, что экономически оправданное предложение AHIC о введении алгоритма исследования только на ТТГ среди определенных категорий пациентов оказалось научно обоснованным и экспериментально доказанным. Использование данного алгоритма в больницах (в том числе в психиатрических) может быть экономически выгодным.

### 28/417 Не слишком ли часто и необоснованно проводится лабораторное исследование функции щитовидной железы?

Are thyroid function tests too frequently and inappropriately requested? E.Roti, E. Gardini, M.G. Magotti, S. Pilla, R. Minelli, M. Salvi, C. Monica, D.Maestri, S. Cencetti, L.E. Braverman. J Endocrinol Invest. 1999; 22(3):184-190. PMID: 10219885

Несмотря на наличие данных, подтверждающих, что определение концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови является лучшим тестом для оценки тиреоидной функции, часто наряду с ТТГ (или отдельно) исследуют уровень циркулирующих в крови тиреоидных гормонов.

В настоящей работе было проанализировано, какие сочетания тестов были назначены врачами для оценки тиреоидной функции, проведена оценка полученных результатов. Данное исследование позволило сделать некоторые предположения о повышении экономической эффективности использования тестов.

Лабораторией университетской клиники в г. Парма (Италия) были проанализированы данные за 1995г. - всего 19181 результат исследований тиреоидной функции у стационарных и амбулаторных больных (45865 различных тестов). Оценивали концентрацию тиреоидных гормонов (Т4, Т4св., Т3, Т3св.) и ТТГ в сыворотке крови. Содержание ТТГ в сыворотке крови ниже или выше нормы принято расценивать как повышение или понижение функции щитовидной железы, т.е. как гипертиреоз (тиреотоксикоз) и гипотиреоз, в том числе и субклинические формы, независимо от результатов других тестов. Проведено исследование содержания гормонов в разных комбинациях и рассчитана доля (процент) каждой из них в общем объеме исследований, что составило: ТТГ+Т4+Т3(56%), ТТГ+Т4св.+Т3св.(14%), ТТГ (12%), ТТГ+Т4св. (9%), ТТГ+Т4 (1%), ТТГ+Т4 +Т3+Т4св.+Т3св.(5%), другие (3%). При использовании тиреоидной панели Т4+Т3+ТТГ (10780 анализов) нормальный уровень ТТГ зарегистрирован в 80,6% случаев, при использовании панели Т4св.+Т3св.+ ТТГ (2590 анализов) нормальный уровень ТТГ отмечен в 73,2% случаев.

Повышенные концентрации ТТГ чаще выявлялись у амбулаторных пациентов, чем у пациентов стационара (9,7% против 7,4%  $p < 0,001$ ).

Т3-токсикоз (повышенный уровень Т3, нормальный уровень Т4 и низкая концентрация ТТГ) и Т4 - токсикоз (повышенный уровень Т4, нормальный уровень Т3 и низкая концентрация ТТГ) были выявлены в 8,1% и 9,4% случаев, соответственно. Повышение концентрации Т3св. и Т4св., диагностированное как Т3- и Т4- токсикоз, выявлено в 7,5% и 4,9%, соответственно. Низкий уровень Т3 и Т3 св. был выявлен у пациентов стационаров в 1,6% и 2,3% случаев, соответственно. Низкий уровень Т4 при низком уровне Т3 обнаружены только в 0,3%, низкий уровень Т4 св. низком уровне Т3св. в 0,2%. Настоящее исследование показало следующее:

а) исследования тиреоидной функции были назначены 20% госпитализированных пациентов, и только у 1 из 14 пациентов выявлена дисфункция щитовидной железы, что подтверждалось отклонением от нормы уровня ТТГ;

б) определение Т4св. (или Т4) является таким же важным как и определение Т3св. (или Т3) при диагностике гипертиреоза;

в) у госпитализированных пациентов с низким уровнем Т3 синдром был менее выражен, о чем ранее сообщалось в литературе, что, вероятно, связано с уменьшением тяжести заболевания;

г) использование комбинации тестов, включающих Т3 и Т3св., являлось необоснованным;

д) определение только концентрации ТТГ в сыворотке крови является наиболее целесообразным при первоначальном исследовании функции щитовидной железы.

### 29/418 Установление референсных интервалов и пороговых значений для антител к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО), к тиреоглобулину (анти-ТГ) и к рецептору тиреотропного гормона (анти-рТТГ).

Establishment of reference distributions and decision values for thyroid antibodies against thyroid peroxidase (TPOAb), thyroglobulin (TgAb) and the thyrotropin receptor (TRAb).

E.A. Jensen, P.H. Petersen, O. Blaabjerg, P.S. Hansen, T.H. Brix, L. Hegedus  
Clin Chem Lab Med., 2006; 44(8): 991-998  
PMID: 16879067

Национальная академия клинической биохимии (NACB) США подчеркивает, что референсные интервалы содержания антител к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО), антител к тиреоглобулину (анти-ТГ) и антител к рецептору ТТГ (анти-рТТГ) должны быть определены для лиц молодого возраста, не имеющих определенных факторов риска, с уровнем ТТГ в сыворотке крови 0,5 и 2,0 мМЕ/л. Однако у некоторых молодых людей, не имеющих факторов риска, обнаруживаются аутоантитела, в связи с чем предложенные подходы могут быть неприемлемы. Распространенность факторов риска не должна оказывать влияния на модель референсных интервалов и пороговых значений.

**Методы.** Авторами настоящего исследования была разработана "логарифмическая модель распределений Гаусса", которая была апробирована на 1441 тщательно подобранных участниках исследования, не имеющих клинических симптомов заболеваний щитовидной железы.

**Результаты.** Анти-ТПО и анти-ТГ были определены у всех участников. С достоверностью 97,5% определенные 1) по традиционным непараметрическим критериям, 2) в соответствии с критериями NACB и 3) на основании оценки параметров испытываемой модели значения анти-ТПО составили 284, 24 и 9,8 кМЕ/л; анти-ТГ - 84, 22 и 19 кМЕ/л, соответственно. Пороговое значение с прогнозируемым уровнем ложных результатов составило 15 кМЕ/л для анти-ТПО и 31 кМЕ/л для анти-ТГ. Концентрации выше референсных значений влияли на соответствующее распределение ТТГ. Верхние пределы значений для анти-рТТГ составили 1) 0,75 и 2) 0,75 МЕ/л, в то время как испытываемая модель оказалась не приемлемой для определения анти-рТТГ, так как высокая функциональная чувствительность модели отмечена только в 2-3% результатов.

**Заключение.** В отличие от NACB испытываемая модель для определения величин анти-ТПО и анти-ТГ является более надежной, так как не зависит от характеристик популяции.

### 30/419 Биологическая вариабельность тиреоидных аутоантител и тиреоглобулина.

Biological variation of thyroid autoantibodies and thyroglobulin.  
E. Jensen, P.H. Petersen, O. Blaabjerg, L. Hegedus  
Clin Chem Lab Med., 2007, 20  
PMID: 17579566

**Введение.** Было показано, что уровень тиреоидных антител влияет на концентрацию ТТГ, как у мужчин, так и у женщин и, что эти аутоантитела в сочетании с ТТГ являются прогностическим предвестником заболеваний ЩЖ. В связи с тем, что биологическая вариабельность этих аутоантител неизвестна, обследовали женщины фертильного возраста в течение одного полного менструального цикла.

**Методы.** В общей сложности 24 здоровых женщин (23-46 лет) обследовали дважды в неделю утром (с 07:30 до 11:00 ч). Определяли содержание в сыворотке крови антител к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО), к тиреоглобулину (анти-ТГ), к рецептору тиреотропина (анти-рТТГ), а также тиреоглобулин (ТГ). Анти-ТПО, анти-ТГ и ТГ определяли при помощи системы AutoDELFIА (Perkin Elmer/Wallac), а анти-рТТГ методом радиорецепторного анализа от Brahms Diagnostica.

**Результаты.** У всех 24 женщин были определены измеримые уровни анти-ТПО и ТГ во всех образцах сывороток, и у 9 женщин - уровни антител, превышающие верхний предел референсного интервала лаборатории (в 6 случаях уровень анти-ТПО составил более 10 кМЕ/л, в 6 случаях уровень анти-ТГ - более 20 кМЕ/л и в 1 случае уровень анти-рТТГ - более 0,75МЕ/л). У восьми женщин уровень ТГ оказался ниже нижнего предела референсного интервала, у 5 из них определен повышенный уровень анти-ТГ. Изменение уровня тиреоидных антител было случайным и не связано с менструальным циклом. Для анти-ТПО (2,2- 258 кМЕ/л) коэффициент (CV) биологической вариации составил 11,3%, тогда как CV аналитической вариации составил 10,6%. Для анти-ТГ (5,6-148 кМЕ/л) CV биологической вариации составил 8,5%, аналитической - 9,0%. У женщины с анти-рТТГ CV биологической вариации составил 4,8%, тогда как CV аналитической вариации в повторях - 3,9% на уровне 2,8 МЕ/л.

**Заключение.** Анти-ТПО и ТГ определены во всех образцах при помощи системы AutoDELFIА. Не обнаружено значительного изменения уровня аутоантител в течение менструального цикла. Коэффициент биологической вариации для анти-ТПО и ТГ составил 11,3% и 8,5%, соответственно.

### 31/420 Установление референсного интервала тиреотропного гормона (ТТГ) у здоровых взрослых людей. Влияние интерферентных факторов, включая уровни тиреоидных антител.

Establishment of a serum thyroid stimulating hormone (TSH) reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies.

E. Jensen , P. Hyltoft Petersen , O. Blaabjerg , P.S. Hansen , T.H. Brix , K.O. Kyvik , L. Heged?s  
Clin Chem Lab Med. 2004; 42(7):824-832  
PMID: 15327019

В более ранних исследованиях было показано, что тиреоидные антитела влияют на концентрацию ТТГ у мужчин и у женщин и, что отклонение от нормы уровня ТТГ является прогностическим предвестником заболеваний ЩЖ. Авторы настоящего исследования проверяли точность рекомендаций Национальной академии клинической биохимии (NACB), касающихся референсного интервала ТТГ. Обследовали 1512 человек. У 250 человек обнаружены только тиреоидные антитела, 121 человек принимали кроме эстрогенов иногда еще и анальгетики, а 105 - сообщили о случаях патологии ЩЖ в семейном анамнезе. Уровень ТТГ, анти-ТПО и анти-ТГ определяли при помощи системы AutoDELFIА, а антител к рецептору ТТГ (анти-рТТГ) при помощи радиорецепторного анализа (RRA) от Brahms Diagnostica. У лиц, не имеющих повышенных концентраций тиреоидных антител и других факторов риска, уровень ТТГ в сыворотке крови не зависел от возраста и пола. Ни прием лекарственных препаратов, ни наличие анти-ТГ не оказывало влияния на концентрацию ТТГ в сыворотке крови. Выявление только анти-ТПО или в сочетании с анти-ТГ связывали с повышенным уровнем ТТГ. Распределение "кумулятивных процентов" в исследуемых подгруппах, так же как в совокупной популяции соответствовало распределению Гаусса. 95% от общей выборки находились в пределах 95%ДИ. Таким образом, общий референсный диапазон для уровня ТТГ в сыворотке, составил 0,58-4,07 мМЕ/л для всех взрослых в возрасте 17- 66 лет. Этот референсный диапазон достоверно отличался от представленного в рекомендациях NACB.

### **32/421 Определение уровня ТТГ , Т4 и тиреоидных антител у населения США (1988 - 1994 гг.): третье Национальное исследование здоровья и питания (NHANES III).**

Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III).

J.G. Hollowell , N.W. Staehling , W.D. Flanders , W.H. Hannon , E.W. Gunter , C.A. Spencer , L.E. Braverman

J Clin Endocrinol Metab., 2002; 87(2):489-499  
PMID: 11836274

В III Национальном исследовании здоровья и питания (NHANES III) определяли содержание ТТГ, общего Т4, анти-ТПО и анти-ТГ в образцах сывороток крови 17353 человек в возрасте 12 лет и старше, в соответствии с этническим составом и географическим распределением населения США. Полученные данные являются основой для определения референсных интервалов этих показателей в США. У 16533 человек, которые отрицали наличие в анамнезе заболеваний ЩЖ или прием анти-тиреоидных препаратов ("условно здоровое население"), определяли средние концентрации ТТГ, Т4, анти-ТГ и анти-ТПО. Из вышеуказанной "здоровой" популяции была сформирована референсная выборка из 13344 человек (из исследования были исключены беременные, лица, принимающих андрогены или эстроге-

ны, лица с наличием повышенного уровня тиреоидных антител и биохимических данных за гипо- или гипертиреоз). Исследовали влияние демографических показателей на уровень ТТГ, Т4 и антител. Гипотиреоз был выявлен у 4,6% населения США (в 0,3% случаев - клинический и в 4,3% случаев - субклинический), гипертиреоз - у 1,3% населения (в 0,5% случаев - клинический и в 0,7% случаев - субклинический). Термин "субклинический гипотиреоз" в данной статье означает легкую степень тяжести гипотиреоза; в настоящее время американская тиреоидная ассоциация предложила использовать этот термин при обнаружении соответствующих гормональных сдвигов при лабораторном исследовании. Для "условно здоровой" популяции среднее значение концентрации ТТГ составило 1,50 мМЕ/л (95%ДИ, 1,46-1,54) и было выше у женщин, чем у мужчин и выше у представителей белой расы - 1,57 мМЕ/л (1,52-1,62), чем у афроамериканцев - 1,18 мМЕ/л (1,14-1,21), ( $p < 0,001$ ) или американцев мексиканского происхождения - 1,43 мМЕ/л (1,40-1,46), ( $p < 0,001$ ). Результаты тестов на анти-ТГ оказались положительными в 10,4 +/- 0,5% случаев, на анти-ТПО - в 11,3 +/- 0,4%; положительные результаты чаще детектировались у женщин, чем у мужчин, отмечалось увеличение количества положительных результатов с возрастом. Анти-ТПО реже детектировались у афроамериканцев (4,5 +/- 0,3%), чем у белых (12,3 +/- 0,5%) ( $p < 0,001$ ). Анти-ТПО были значительно связаны с гипо- или гипертиреозом, в то время как для анти-ТГ подобной ассоциации не выявлено. При обследовании референсной популяции среднегеометрическое значение уровня ТТГ составило 1,40 +/- 0,02 мМЕ/л, увеличивалось с возрастом, и было значительно ниже у афроамериканцев (1,18 +/- 0,02 мМЕ/л), чем у белых (1,45 +/- 0,02 мМЕ/л) ( $p < 0,001$ ) и у американцев мексиканского происхождения (1,37 +/- 0,02 мМЕ/л) ( $p < 0,001$ ). Среднеарифметическое значение общего Т4 составило 112,3 +/- 0,7 нмоль/л в "условно здоровой" популяции и было стабильно выше у американцев мексиканского происхождения во всех группах населения. В референсной популяции среднее значение общего Т4 у американцев мексиканского происхождения составило 116,3 +/- 0,7 нмоль/л, что было значительно выше, чем у белых (110,0 +/- 0,8 нмоль/л) или афроамериканцев (109,4 +/- 0,8 нмоль/л) ( $p < 0,0001$ ). Различия сохранялись во всех возрастных группах. Таким образом, в ходе исследования было установлено, что уровень ТТГ и распространенность тиреоидных антител выше у женщин и увеличиваются с возрастом; также выше у представительниц белой расы и американцев мексиканского происхождения, чем у афроамериканцев. Наличие только анти-ТГ при отсутствии анти-ТПО не было связано с патологией ЩЖ. Меньшая распространенность тиреоидных антител и более низкие концентрации ТТГ у афроамериканцев требуют дальнейшего изучения для сопоставления полученных результатов с клиническим статусом. Значительная часть населения США не подозревает о наличии патологии ЩЖ, что подтверждает целесообразность скрининговых исследований для раннего выявления патологии.

### 33/422 Исследование уровня гормонов щитовидной железы и тиреоидных антител при изучении состояния здоровья населения: оценка тиреоидного статуса у населения Басселтона.

Investigations of thyroid hormones and antibodies based on a community health survey: the Busselton thyroid study.

P.C. O'Leary , P.H. Feddema , V.P. Michelangeli , P.J. Leedman , G.T. Chew , M. Knuiiman , J. Kaye , J.P. Walsh

Clin Endocrinol (Oxf)., 2006; 64(1):97-104

PMID: 16402936

**Цель.** Нарушения функции щитовидной железы (клинические и субклинические формы) достаточно широко распространены среди населения Басселтона (Австралия), однако еще недостаточно изучено значение небольших отклонений лабораторных показателей от нормы. Цель настоящего исследования заключалась в следующем: а) установить референсные интервалы содержания в сыворотке крови свободного Т4, ТТГ и тиреоидных антител - анти-ТПО и анти-ТГ; б) определить распространенность повышенных уровней ТТГ среди населения Басселтона, расположенного на юго-западе Австралии.

**Дизайн исследования.** В кросс-секционном медицинском исследовании, проводившемся в 1981 году, приняли участие 2115 человек, проживающих в Басселтоне. Исследование включало анализ крови и оценку результатов анкетирования о состоянии здоровья и образе жизни.

**Методы.** Образцы сывороток крови исследовали на Т4 св., ТТГ, анти-ТПО и анти-ТГ при помощи иммунохемилюминисцентных методов.

**Результаты.** На основе стандартных статистических подходов и рекомендаций Национальной академии клинической биохимии (NACB), были установлены референсные интервалы уровней для каждого анализируемого показателя: 9-23 пмоль/л для Т4 св.; 0,4-4,0 мМЕ/л для ТТГ; менее 35 кМЕ/л для анти-ТПО и менее 55 кМЕ/л для анти-ТГ. Повышенный уровень тиреоидных антител отмечен у 12,4% населения с отсутствием заболеваний в ЦЖ в анамнезе и чаще среди женщин, чем среди мужчин. Повышенные уровни тиреоидных антител наблюдались на всем диапазоне концентраций ТТГ, но были выше при значениях ТТГ более 4,0 мМЕ/л (в 63% случаев), чем в тех случаях, когда уровень ТТГ находился в пределах 0,4- 4,0 мМЕ/л (7,8%).

**Заключение.** В настоящем исследовании установлена распространенность антител к тиреоидной пероксидазе и к тиреоглобулину, а также референсные интервалы для свободного Т4 и ТТГ. При обследовании мужчин и женщин пожилого возраста в соответствии с рекомендациями NACB выявлено значительное увеличение уровня аутоантител в сравнении с референсными показателями по полу и возрасту.

**34/423 Оценка степени зоба, содержания тиреотропного гормона, тиреоидных аутоантител в сыворотке крови и концентрации йода в моче у взрослых людей, проживающих в Тегеранской провинции до и после реализации национальной программы йодирования соли.** Goiter rate, serum thyrotropin, thyroid autoantibodies and urinary iodine concentration in Tehranian adults before and after national salt iodization.

P. Heydarian , A. Ordoorkhani , F. Azizi  
J Endocrinol Invest., 2007; 30(5):404-410  
PMID: 17598973

Степень зоба, уровни ТТГ, анти-ТПО, анти-ТГ, а также концентрацию йода в моче (КИМ) оценивали на протяжении 10-11 лет до начала проведения Национальной программы йодирования соли в Иране (с 1983-1984гг.) и в течение 5-6 лет после реализации программы (до 1999-2000гг.). Группы обследуемых до и после йодирования включали 465 и 1426 человек (соответственно) в возрасте 20 лет и старше, отобранных методом случайной выборки в провинции Тегеран. Зоб в целом, зоб 1 степени и зоб 2 степени были выявлены в 65,2; 53,1 и 12,1% случаев, соответственно в 1983-1984гг. против 25,2; 15,5 и 9,7%, соответственно в 1999-2000гг. ( $p < 0,0001$ ). Средний уровень ТТГ в сыворотке крови составил 1,5 мМЕ/л в 1983-1984гг. против 0,8 мМЕ/л в 1999-2000гг. ( $p < 0,0001$ ). Отмечено снижение среднего уровня ТТГ у лиц в возрасте 20-29, 30-39, 40- 49,50-59 лет, 60 лет и старше в 1983-1984гг. по сравнению с 1999-2000гг. ( $p < 0,0001$ ). В 1983-1984гг. повышенные уровни анти-ТПО и анти-ТГ выявлены в 3,2 и 4%, соответственно, при помощи агглютинационного теста. Значения этих показателей в 1999-2000гг. составили 12,5 и 16,8%, соответственно, при использовании иммуноферментного анализа. В 1983-1984гг. явный (клинически выраженный) гипотиреоз не выявлен, показатель выявляемости субклинического гипотиреоза составил 32,8/1000 населения, в то время как в 1999-2000гг. эти показатели составили 3,5 и 21,7/1000 населения, соответственно. Явный и субклинический гипертиреоз обнаружен у 4,4 и 4,4/1000 населения в 1983-1984гг. против 0,7 и 5,6/1000 в 1999-2000гг., соответственно. Субклинический гипотиреоз у мужчин встречался чаще в 1983-1984гг., чем в 1999-2000гг. (ОШ 5,02, 95% ДИ, 1,72-14,68;  $p = 0,004$ ). Йодирование соли привело к нормализации КИМ, снижению уровня ТТГ в сыворотке, уменьшению распространенности субклинического гипотиреоза среди мужчин и повышению уровня тиреоидных антител без существенного увеличения размеров щитовидной железы. Показана эффективность всеобщего йодирования соли для уменьшения йоддефицитных заболеваний у населения Тегеранской провинции.

### 35/424 Агрегация тиреоидных аутоантител у близких родственников пациентов с аутоиммунным заболеванием щитовидной железы, обусловленная, главным образом, генетической предрасположенностью: исследование близнецов.

Aggregation of thyroid autoantibodies in first-degree relatives of patients with autoimmune thyroid disease is mainly due to genes: a twin study.

T.H. Brix , P.S. Hansen , K.O. Kyvik , L. Hegedus  
Clin Endocrinol (Oxf)., 2004; 60(3):329-334  
PMID: 15008998

В семейных исследованиях неоднократно выявляли агрегацию аутоантител к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО), тиреоглобулину (анти-ТГ) у близких родственников (первой степени родства) пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АЗЩЖ). Этот феномен обычно интерпретируют как доказательство роли генов в образовании тиреоидных аутоантител. Однако в этих исследованиях не было показано, чем обусловлена семей-

ная агрегация этих антител - семейно-генетической предрасположенностью или влиянием окружающей среды.

**Цель исследования.** Проверить гипотезу о том, что семейная агрегация тиреоидных аутоантител в значительной степени обусловлена генетически.

**Дизайн исследования.** Проведено сравнительное кросс-секционное исследование среди пар близнецов (двойняшек) - здоровых и страдающих АЗЩЖ.

Исследование проводили среди 38 пар двоен (в каждой паре - один здоровый близнец, другой - страдающий АЗЩЖ) и среди 76 здоровых близнецов контрольной группы, подобранных по возрасту, полу и зиготности, и не имеющих родственников первой степени родства с АЗЩЖ.

Оценивали распространенность анти-ТПО, анти-ТГ и антител к рецептору ТТГ - анти-рТТГ.

**Методы.** Все антитела определяли при помощи коммерческих наборов. Уровни антител в сыворотке крови оценивали как повышенные при значениях для анти-ТПО более 60 Ед/мл, для анти-ТГ более 60 Ед/мл и для анти-рТТГ более 10 Ед/л. Зиготность определяли при помощи метода ДНК-фингерпринта.

**Результаты.** Распространенность анти-ТПО, анти-ТГ и анти-рТТГ у 38 здоровых близнецов составила 34% (13/38),

26% (10/38) и 13% (5/38) соответственно, и была выше, чем распространенность соответствующих антител в контрольной группе: 9% (7/76;  $p=0,002$ ), 7% (5/76;  $p=0,006$ ) и 1,3% (1/76;  $p=0,015$ ), соответственно. Сочетание двух или более видов тиреоидных аутоантител также было более распространено в основной группе (10/38 и 26%), чем в контрольной (2/76 и 3%),  $p=0,0001$ . У здоровых близнецов из монозиготных (однойцовых) двоен распространенность анти-ТПО, анти-ТГ и анти-рТТГ составила 53%, 47% и 20%, соответственно, по сравнению с близнецами из дизиготных (двуяйцовых) двоен - 22% ( $p=0,045$ ), 13% ( $p=0,02$ ) и 9% ( $p=0,36$ ), соответственно. У монозиготных близнецов значительно чаще определялись повышенные уровни двух или более видов антител, чем у дизиготных близнецов (8/15 против 2/23,  $p=0,006$ ).

**Выводы.** У здоровых родственников первой линии пациентов с АЗЩЖ отмечена статистически значимая кластеризация тиреоидных аутоантител. Кроме того, выявлено различие в распространенности тиреоидных аутоантител у здоровых монозиготных и дизиготных близнецов и их братьев (сестер) с АЗЩЖ. Эти наблюдения подтверждают гипотезу о том, что семейная агрегация тиреоидных аутоантител обусловлена, главным образом, генетически.

ВНИМАНИЕ НОВИНКИ!

**НАЧАТ ВЫПУСК НОВЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ  
ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
МАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ:**

**ДС-ИФА-Тироид-ТТГ**

**ДС-ИФА-Тироид-Т4-общий**

**ДС-ИФА-Тироид-Т4-свободный**

**ДС-ИФА-Тироид-Т3-общий**

**ДС-ИФА-Тироид-Т3-свободный**

**ДС-ИФА-Тироид-ТГ**

**ДС-ИФА-Тироид-анти-ТПО**

**ДС-ИФА-Тироид-анти-ТГ**

ВНИМАНИЕ НОВИНКИ!

## Лабораторная диагностика онкологических заболеваний

### 36/425 Изменения исходного уровня ПСА среди мужского населения Японии в период с 1988г. по 2003г.

Changes in baseline PSA levels in Japanese men from 1988 to 2003.

M.Ohi, K.Ito, T.Yamamoto, M.Miyakubo, H.Takechi, Y.Kubota, K.Suzuki  
Urology., 2008 May 1  
PMID: 18455775

**Цель исследования.** Согласно данным эпидемиологических исследований, проводившихся в Японии в период с 1970г. по 2006г., число случаев смерти от рака предстательной железы (РПЖ) среди мужчин резко возросло. Тем не менее, установить истинную картину заболеваемости и смертности от рака предстательной железы достаточно сложно, поскольку порядок оформления свидетельств о смерти и система государственного ракового регистра в Японии несовершенны. Недавние исследования по изучению уровня простата-специфического антигена (ПСА), продемонстрировали, что изменение исходного уровня ПСА может быть одним из важнейших прогностических факторов развития рака предстательной железы. В связи с этим была выдвинута гипотеза, что динамика показателей уровня ПСА, выявленная при скрининговых обследованиях населения, может отражать тенденцию заболеваемости РПЖ.

**Методы.** Скрининговые обследования для выявления РПЖ среди мужского населения префектуры Гунма (Япония) проводились в период с 1988г. по 2003г. В исследовании приняли участие 32 274 мужчин, в возрасте 50-79 лет. Изучали изменения исходного уровня ПСА в данной возрастной группе на протяжении 5 лет. Ежегодно регистрировались также колебания уровня ПСА в зависимости от возраста пациента.

**Результаты.** Средний уровень ПСА составил 0,9-1,2 нг/мл и в дальнейшем не повышался.

На протяжении 16-летнего периода исследования не было обнаружено тенденций к увеличению числа пациентов с уровнем ПСА выше 2,0; 4,0 или 10,0 нг/мл в пределах того же возрастного диапазона.

**Заключение.** Данные эпидемиологических исследований, свидетельствующие о росте показателей заболеваемости и смертности от РПЖ в Японии, могли оказаться ошибочными.

Скрининговое обследование мужского населения в Японии по изучению динамики исходных показателей ПСА показало, что истинные показатели заболеваемости РПЖ, вероятнее всего, практически не изменялись на протяжении 16 лет.

### 37/426 Использование индекса плотности простата-специфического антигена (ПСА D) для диагностики рака простаты у мужского населения Китая с уровнем ПСА 4-10 нг/мл.

The use of prostate specific antigen (PSA) density in detecting prostate cancer in Chinese men with PSA levels of 4-10 ng/mL.

X.Y. Zheng, L.P. Xie, Y.Y. Wang, W.Ding, K. Yang, H.F. Shen, J. Qin, Y. Bai, Z.D. Chen  
J Cancer Res Clin Oncol., 2008 Apr 30  
PMID: 18446367

**Цель исследования.** Изучить целесообразность вычисления индекса плотности простата-специфического антигена (ПСА D) для выявления рака простаты у мужчин с концентрацией ПСА в сыворотке крови на уровне 4-10 нг/мл.

**Методы.** В скрининговом исследовании на наличие рака простаты, проводившемся в период с января 2003 г. по ноябрь 2007 г., приняли участие 237 мужчин в возрасте 48-84 лет (медиана 71), с уровнем общего ПСА 4-10 нг/мл. Пациентам было выполнено трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) с определением размеров простаты и биопсия. Полученные показатели каждого исследуемого параметра (уровня свободного и общего ПСА в сыворотке крови, их соотношения - ПСА св./ ПСА общ.) и плотности ПСА с целью определения их диагностической значимости были обработаны с помощью ROC - анализа.

**Результаты.** Рак предстательной железы был диагностирован у 44 (18,6%) из 237 пациентов, которым была выполнена биопсия. Были обнаружены существенные различия в размерах и объеме простаты (по данным ТРУЗИ), значениях плотности ПСА, концентрации свободного и общего ПСА и их соотношений, в то же время не выявлено четкой зависимости этих показателей от возраста пациента. Площадь под кривой у показателя уровня ПСА (0,6786) и площадь под кривой у показателя плотности ПСА (0,717) были аналогичными, но значительно больше, чем площадь под кривой у соотношения ПСА св./ПСА общ. (0,329). Индекс ПСА D оказался более надежным при диагностике рака простаты, чем соотношение ПСА св./ПСА общ. Чувствительность и специфичность при определении индекса ПСА D при cutoff равном 0,134 нг/мл, составили 90 и 33,7%, соответственно.

**Вывод.** Индекс ПСА D оказался лучшим предиктором рака простаты у мужчин с уровнем ПСА 4-10 нг/мл, особенно у тех, кому ранее проводилось УЗИ для определения размеров простаты. Полученные результаты исследования свидетельствуют о необходимости расчета значений cutoff исследовать для индекса ПСА D при обследовании мужского населения Китая.

### 38/427 Биомаркеры раннего обнаружения рака простаты.

Biomarkers for early prostate cancer detection.

M.Margreiter, A.Stangelberger, E.Valimberti, R.Herwig, B.Djavan  
Minerva Urol Nefrol., 2008; 60(1):51-60  
PMID: 18427435

Открытие простата-специфического антигена (ПСА) в 1990-е годы произвело революцию в диагностике рака простаты на ранней стадии. С того времени ПСА стал маркером, определение которого считается обязательным для диагностики рака предстательной железы (РПЖ) и последующего диспансерного наблюдения пациентов. Несмотря на высокую диагностическую значимость, ПСА не является ракоспецифическим маркером. ПСА в высоких концентрациях может присутствовать как в здоровой ткани, так и злокачественной и доброкачественной ткани простаты, что может приводить к значительному количеству ложноположительных результатов. В связи с этим актуален поиск новых маркеров, с помощью которых будет возможно отличить доброкачественные новообразования от злокачественных, вялотекущий рак от агрессивного, а также изменить подход к лечению и снизить потенциальный риск развития РПЖ. Достижения последних лет в области биотехнологии позволили выявить новые потенциальные биомаркеры,

циркулирующие в крови, в отношении которых в настоящее время уже ведутся исследования. Данная статья содержит обзор научной литературы о новых биомаркерах для ранней диагностики рака простаты.

### **39/428 Анализ перепадов уровня простата-специфического антигена при локализованном раке предстательной железы после внутритканевой лучевой терапии при помощи имплантации изотопов радиоактивного йода I-125.**

Analysis of prostate-specific antigen bounce after I (125) permanent seed implant for localised prostate cancer.

D.M. Mitchell, R. Swindell, T. Elliott, J.P. Wylie, C.M. Taylor, J.P. Logue  
Radiother Oncol., 2008, Apr 29  
PMID: 18453022

**Цель исследования.** Описать влияние внутритканевой лучевой терапии рака предстательной железы (РПЖ) при помощи имплантации изотопов радиоактивного йода I-125 (брахитерапия) на повышение уровня простата-специфического антигена (ПСА) в исследуемой популяции и выявить биохимический рецидив заболевания после окончания курса брахитерапии.

**Материалы и методы.** В настоящем исследовании, проводившемся в период с февраля 2000г. по май 2005г., приняли участие 374 пациента с локализованным РПЖ, получавшие длительную брахитерапию простаты I-125 в одном и том же лечебном учреждении.

Собранная база данных использовалась для установления амплитуды колебания уровня ПСА, определяемых как повышение уровня на 0,2нг/мл относительно наименьшего исходного значения с последующим снижением до этого же уровня (или ниже) без лечения. Пациенты, получающие неoadъювантную и адъювантную гормонотерапию, были исключены из исследования. Для выявления биохимического рецидива использовали критерии Американского общества терапевтической радиологии и онкологии (ASTRO) и научно-исследовательского института генетики в Фениксе (Аризона, США) - "надир плюс 2 нг/мл".

**Результаты.** 205 пациентов наблюдались в течение 24 - 85 месяцев (в среднем 45 месяцев). У 79 (37%) мужчин было выявлено колебания уровня ПСА, регистрируемые в среднем на 14,8 месяце (1,7-40,6) имплантации I-125. Средний уровень ПСА составил 1,8 нг/мл (0,4-7,4), при этом средняя величина амплитуды колебания уровня ПСА составила 0,91 нг/мл (0,2-5,8).

Когда все факторы до- и после проведения брахитерапии, влияющие на колебание уровня ПСА, были изучены, выяснилось, что статистически значимым является только молодой возраст пациента ( $p=0,002$ )

Пороговое значение ПСА для выявления биохимического рецидива, согласно оценке ASTRO (1997), было выявлено у 4 (5%) пациентов, имеющих значительные перепады уровня ПСА в отличие от 19 (15%) пациентов с незначительными изменениями уровня ПСА ( $p=0,01$ ).

Пороговое значение по данным Феникс (низшая точка +2нг/мл) было определено у 6 пациентов (7,5 %) после резкого повышения уровня ПСА и у 22 (17 %) пациентов с незначительными изменениями уровня ПСА ( $p=0,003$ ). Было также установлено, что повышение уровня ПСА в обоих случаях оказалось ложноположительным.

Средняя скорость прироста уровня ПСА в период резкого повышения составила 0,08 нг/мл/месяц (0,02-0,98) и была статистически значительно ниже, чем средняя скорость при возникновении биохимического рецидива по оценке Феникс - 0,28 нг/мл/месяц (0,07-2,04) ( $p=0,0005$ ).

**Заключение.** Резкое повышение уровня ПСА, обнаруженное в группе исследования, связано с более низкой возможностью развития биохимического рецидива в дальнейшем. Выявленные различия в скорости прироста уровня ПСА требуют дальнейших исследований для подтверждения. Пациенты должны быть информированы о возможных повышениях уровня ПСА во время и после длительной брахитерапии простаты. Врачи, курирующие пациентов, получающих брахитерапию простаты, должны знать об этом явлении; это позволит им оценивать уровень ПСА в динамике, избежать преждевременного назначения терапии при резких повышениях уровня ПСА.

**ВНИМАНИЕ НОВИНКИ!**

**НАЧАТ ВЫПУСК НОВЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОНКОМАРКЕРОВ:**

**ДС-ИФА-ПСА-общий**

**ДС-ИФА-ПСА-свободный**

## Вопросы качества лабораторных исследований

### 40/429 Ошибки в клинических лабораториях или ошибки в лабораторной медицине?

Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine?

M. Plebani

Clin Chem Lab Med. 2006; 44(6):750-759

PMID: 16729864

Лабораторная диагностика - очень сложный процесс и, хотя лабораторные тесты относительно надежны, они не являются такими надежными, какими могли и должны быть. Клинические лаборатории уже давно используют методы и программы контроля качества аналитической стадии лабораторных исследований. Большой объем накопленных за последние десятилетия фактических данных, показывает, что качество клинических лабораторных исследований не может быть достигнуто только решением проблем на этапах лабораторного анализа. Результаты последних исследований по изучению ошибок в лабораторной медицине позволяют сделать вывод о том, что ошибки чаще встречаются на преаналитическом постаналитическом этапах лабораторного анализа. Исследования показали, что на ошибки на преаналитический этап приходится 46-68,2% всех ошибок, а на постаналитический - 18,5-47%. Доля ошибок на аналитическом этапе значительно снизилась в последнее время. Однако есть данные (особенно касающиеся иммунологических исследований) о том, что ошибки анализа могут оказывать неблагоприятное психологическое влияние на пациентов. В связи с этим в настоящей работе представлено описание наиболее типичных ошибок и факторов риска на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах лабораторных исследований, а также даны практические рекомендации по предупреждению ошибок. Многие ошибки в общем процессе исследования называют "лабораторными ошибками", хотя причинами их могут быть: непонимание, действия персонала других подразделений ЛПУ, участвующего в процессе исследования (например, врачей, медицинских сестер, процедурных медсестер осуществляющих забор крови) или неверные действия, которые находятся вне контроля лаборатории. Кроме того, имеются данные, что инструкции по выполнению лабораторных работ соблюдаются лишь частично. Недавний документ Международной организации по стандартизации (ISO) рекомендует более точное, расширенное определение понятия "лабораторная ошибка" и классификацию ошибок исходя из разных критериев. В современном подходе к качеству лабораторных исследований в целом, удовлетворяющему потребности пациентов, риск ошибок на преаналитическом и постаналитическом этапах исследования должен быть сведен к минимуму, чтобы гарантировать высокое качество лабораторных услуг.

### 41/430 Ошибки в работе лаборатории: типы и частота.

Mistakes in a stat laboratory: types and frequency.

M Plebani, P Carraro

Clin Chem. 1997; 43(8 Pt 1):1348-1351

PMID: 9267312

Согласно требованиям Общего Руководства Качеством (Total Quality Management) весь процесс лабораторного исследования, включающий преаналитический и постаналитический этапы, должен быть управляем для того, чтобы уменьшить количество, а в идеале - свести к нулю все ошибки процесса. Представляется, что сама по себе "ошибка" должна трактоваться как любой дефект на протяжении всего процесса исследования: с момента назначения исследования до получения результатов. В настоящем исследовании оценивали частоту и типы ошибок, обнаруженных в экспресс-лаборатории отделения экстренной (скорой) медицинской помощи университетской клиники г. Падова (Италия) при проведении мониторинга в 4 разных отделениях (терапии, нефрологии, хирургии и интенсивной терапии) в течение 3 месяцев. При анализе 40490 исследований было выявлено 189 лабораторных ошибок с относительной частотой 0,47%. В структуре всех ошибок ошибки на преаналитическом этапе составили 68,2%, на аналитическом этапе - 13,3% и на постаналитическом - 18,5%. Большинство лабораторных ошибок (74%) не влияли на результаты анализов пациентов. Однако у 37 пациентов (19%) с лабораторными ошибками было связано проведение ненужных дополнительных исследований, приводящих к неоправданному увеличению затрат. Кроме того, у 12 пациентов (6,4%) лабораторные ошибки были связаны с ненадлежащим уходом или с необоснованными назначениями. Усиление контроля качества и постоянное совершенствование всего процесса исследования, включающего преаналитический и постаналитический этапы, видимо, являются необходимым условием для повышения эффективности лабораторного обслуживания.

### 42/431 Ошибки в работе лаборатории: типы и частота (10 лет спустя).

Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later.

P. Carraro, M. Plebani

Clin Chem., 2007; 53(7):1338-1342

PMID: 17525103

В свете повышенного внимания к обеспечению безопасности пациентов и необходимости снижения лабораторных ошибок, важно, чтобы клинические лаборатории собирали статистические данные об ошибках на протяжении всего процесса исследования, включающего преаналитический, аналитический и постаналитический этапы.

**Методы.** Мониторинг ошибок в процессе лабораторного исследования в 4 отделениях разного профиля (терапии, нефрологии, хирургии и интенсивной терапии) в 2006 году

проводили аналогично ранее проведенному в 1996 году. В течение 3 месяцев врачи и медицинские сестры уделяли пристальное внимание результатам всех клинических исследований. Любые предположения о лабораторной ошибке рассматривались во взаимосвязи с соответствующей клинической информацией. Каждый день врач лаборатории посещал все 4 отделения и давал критическую оценку результатам, вызывающим сомнения.

**Результаты.** При анализе результатов проведенных 51746 исследований в 393 случаях результаты вызвали сомнения, из которых в 160 случаях подтвердились лабораторные ошибки. Общая частота ошибок 3092 ppm (на 1млн.) оказалась значительно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в 1996 году (4700 ppm). Из 160 подтвержденных ошибок 61,9% составили преаналитические ошибки, 15% - аналитические и 23,1% - постаналитические.

**Выводы.** Отмечено значительное сокращение ошибок в данной лаборатории за последнее десятилетие. Достаточно большое количество ошибок все еще регистрируется на преаналитическом и постаналитическом этапах, однако отмечены изменения в типах и частоте ошибок на этих стадиях исследования.

#### **43/432 Лаборатория является ключевым партнером в деле обеспечения безопасности пациентов.**

The laboratory is a key partner in assuring patient safety. A.K. Stankovic  
Clin Lab Med., 2004; 24(4):1023-1035  
PMID: 15555754

Медицинские ошибки оказывают негативное влияние на состояние пациента. Они могут нанести серьезный вред здоровью пациента или даже привести его к смерти. Тем не менее, снижения показателей заболеваемости и смертности иногда можно добиться своевременными и эффективными действиями медицинских работников. Несколько докладов института здравоохранения США было посвящено медицинским ошибкам, их выявлению, выработке рационального решения проблем и мер по их реализации. Служба клинической лабораторной диагностики, являющаяся частью учреждений системы здравоохранения, также не застрахована от ошибок. Результатом определенных усилий, предпринимаемых как лабораторной службой, так и производителями лабораторного оборудования и реактивов, явилось то, что ошибки на аналитическом этапе стали составлять очень малую долю от общего количества ошибок, выявляемых в процессе исследования. В настоящее время ошибки чаще всего встречаются на преаналитическом этапе исследования. Основная причина преаналитических ошибок заключается в том, что очень сложно проконтролировать все составляющие преаналитического этапа и внести необходимые корректировки и изменения, особенно в тех случаях, когда некоторые составляющие (как, например, забор крови), находятся вне лабораторного контроля. В целях сокращения количества ошибок при выполнении лабораторных исследований были предприняты значительные усилия, как специалистами лабораторий, так и специалистами других заинтересованных сторон. Для повышения качества лабораторных исследований и производства медицинского лабораторного оборудования и реактивов были разработаны нормативные и технологические подходы. К ним относятся лабораторные стандарты,

различные программы по улучшению качества, добровольная отчетность в случаях неблагоприятных обстоятельств и, в ближайшем будущем, Национальный доклад о повышении качества лабораторной службы. Внедрение эффективных подходов из других отраслей, таких как принцип обеспечения качества ("Six Sigma") и принцип "бережливого" производства ("Lean"), также поможет снизить уровень лабораторных ошибок. В сфере клинической лабораторной диагностики сделано гораздо больше, чем в большинстве других секторов здравоохранения для сокращения количества медицинских ошибок, что делает ее ключевым партнером в обеспечении безопасности пациентов.

#### **44/433 Влияние преаналитических факторов на качество результатов лабораторных исследований. Обзор.**

Preanalytical variables and their influence on the quality of laboratory results.

SNarayanan, G.Walter, W.G. Guder

[http://](http://www.ifcc.org/ejifcc/ejifcc/vol13no1/1301200107n.htm)

[www.ifcc.org/ejifcc/ejifcc/vol13no1/1301200107n.htm](http://www.ifcc.org/ejifcc/ejifcc/vol13no1/1301200107n.htm)

#### **Резюме**

Стандарты лабораторных исследований разработаны в соответствии с установленными критериями качества, однако единого стандарта по проведению преаналитического этапа исследования не существует.

Недавно были опубликованы рекомендации по обеспечению качества исследуемых образцов, включающие определение оптимального объема образца, использование антикоагулянтов и стабилизаторов, правила транспортировки и хранения, обработки гемолизированных, липемических и иктерических образцов сыворотки крови. Национальными и международными организациями по разработке стандартов были созданы рекомендации по технике забора клинического материала для исследования, транспортировке и осуществлению идентификации. Назрела острая необходимость в разработке руководства по обеспечению качества преаналитического этапа в целях достижения качества лабораторного анализа в целом. Ежедневно лаборатории сталкиваются с проблемой получения недостоверных результатов анализов из-за ошибок на преаналитическом этапе исследования. Готовность признавать и исправлять допущенные ошибки является необходимым условием для обеспечения качества всего процесса лабораторного анализа; изложенные принципы проиллюстрированы конкретными примерами из практики.

#### **Введение**

Преаналитический этап исследования - важная составляющая всего лабораторного процесса (Narayanan S, 2000; Guder WG, 1996; Young DS, 1997; Guder WG, 1999), включающего: забор материала для исследования, регистрацию данных с учетом физиологических (образ жизни, возраст, пол, беременность, менструальный цикл) и эндогенных параметров (например, прием лекарственных препаратов, наличие в крови антител). Некоторые переменные факторы преаналитического этапа (например,

характеристики исследуемого образца) можно проконтролировать, в то время как неконтролируемые факторы также должны быть четко определены, для того, чтобы исключить их влияние на результаты клинических лабораторных исследований. В последнее десятилетие преаналитическому этапу исследования уделяется большое внимание, что привело к разработке рекомендаций и стандартов.

### Рекомендации и стандарты по проведению преаналитической стадии исследования.

В последние годы было разработано несколько рекомендаций и стандартов по проведению преаналитического этапа (The Quality of Diagnostic Samples. GIT, 2000; Guder WG, 2000; DIN ISO 6710, 1996). Ученые немецкого общества клинической химии (DGLM) и немецкого общества лабораторной медицины предложили всесторонние требования к качеству диагностических образцов (The Quality of Diagnostic Samples. GIT, 2000), а позднее - к обработке гемолизированных, липемических и иктерических образцов (Guder WG, 2000). Требования к качеству диагностических образцов содержат информацию относительно выбора используемых антикоагулянтов и стабилизаторов, оптимального объема образца в соответствии с условиями определения каждого аналита. Наряду с рекомендациями по забору образцов, центрифугированию, правилами транспортировки и хранения описаны плюсы и минусы использования плазмы и сыворотки крови для анализа (The Quality of Diagnostic Samples. GIT, 2000). Оптимальный объем анализируемого образца был определен из расчета двойного объема сыворотки (или плазмы), требуемого для лабораторного исследования, плюс полный объем образца, необходимый для заполнения лунки, с учетом повторностей и переноса во вторичные пробирки. Обычно для 20 биохимических анализов необходимо 3-4 мл цельной крови для получения гепаринизированной плазмы, тогда как для получения сыворотки крови необходимо 4-5 мл цельной крови. Для выполнения гематологических и коагуляционных тестов достаточно 2-3 мл крови с добавлением ЭДТА и цитрата Na, соответственно. Для выполнения 3-4 постановок ИФА достаточно 1 мл цельной крови. Для измерения скорости седиментации эритроцитов достаточно 2-3 мл крови с добавлением цитрата Na. Для анализа газового состава артериальной крови достаточно 50 мкл капиллярной крови, тогда как при заборе крови из вены для анализа необходимо получить 1 мл гепаринизированной крови (The Quality of Diagnostic Samples. GIT, 2000). В нормативных документах (требованиях) к качеству диагностических образцов приведен также исчерпывающий перечень аналитов (определяемых веществ) и компонентов, а также их стабильность в образце (The Quality of Diagnostic Samples. GIT, 2000).

Всестороннее обсуждение механизмов гемолиза, определение причин липемии и характеристики иктерического образца включены в документ о гемолизированном, иктерическом и липемическом образцах сыворотки крови (Guder WG, 2000). Этот документ содержит также инструкции по обработке гемолизированных образцов, предложения по предотвращению развития липемии и методики позволяющие избежать интерференции билирубина в иктерических образцах, существенно дополнив и расширив

тем самым рекомендации Национального комитета стандартов для клинических лабораторий (NCCLS) предыдущего издания (NCCLS. Specimen Collection. Villanova, PA, USA: Document SC2-L, 1999).

Коллегия американских патологов, занимающаяся вопросами сертификации и аккредитации лабораторий, подготовила критерии подготовки образцов на преаналитическом этапе исследования (Pathologists Laboratory Accreditation Program, 2000).

Международная организация по стандартизации разработала стандарты ISO 6710 по использованию вакуумных систем забора крови (DIN ISO 6710, 1996).

Национальный комитет стандартов - NCCLS - в США регулярно издает инструкции по различным аспектам преаналитического этапа. Новый перечень стандартов опубликован в последнем каталоге NCCLS.

### Меры по обеспечению качества преаналитического этапа

Создание руководства по качеству преаналитических процедур является необходимым условием для выполнения мер по обеспечению качества этого важного этапа лабораторного исследования, которое не может быть обеспечено традиционными методами контроля и оценки качества.

Руководство по качеству проведения преаналитического этапа должно включать как рекомендации по подготовке пациентов к лабораторным исследованиям, так и стандарты (требования) к характеристикам (параметрам) образца. В связи с этим, руководство по качеству должно определить минимальный объем образца, необходимый для лабораторного анализа, и привести формулы для подсчета оптимального количества забираемого аналита, достаточного для проведения всех требуемых исследований (тестов).

Оптимальный объем крови для исследования необходимо определять для того, чтобы недопустить забор необоснованно большого количества крови, что может привести к развитию ятрогенной анемии. В руководстве должны быть представлены также и инструкции по идентификации образцов. При подготовке к сдаче анализов пациенты должны соблюдать некоторые рекомендации. В частности, пациенты должны знать, что кровь для большинства исследований забирается строго натощак (т.е. когда между последним приемом пищи взятием крови проходит не менее 12 часов), в утренние часы; в дни, предшествующие исследованию необходимо соблюдать определенную диету; накануне и непосредственно перед сдачей крови нужно исключить физическое напряжение и эмоциональное возбуждение. В руководстве должны также содержаться основные требования подготовки пациента к процедуре сдачи и других биологических жидкостей организма (например, мочи).

Должны быть четко прописаны инструкции, касающиеся обработки, транспортировки и условий хранения образцов (Guder WG, 1996).

Руководство по качеству должно содержать полный перечень аналитов и сведения о наиболее часто встречающихся побочных эффектах.

И, наконец, поскольку руководство по качеству будет основным нормативным документом для специалистов

лабораторий, в дальнейшем в него должны быть включены обновленные библиографические стандарты преаналитического этапа и каталог возможных эффектов интерференции.

### Выявление преаналитических ошибок, искажающих результаты лабораторных исследований.

Каждая лаборатория должна выработать стратегию по выявлению преаналитических ошибок. В настоящем обзоре приведены примеры преаналитических ошибок, встречающихся в клинической практике.

#### Случай из практики №1

Содержание калия в сыворотке крови 55-летнего пациента на момент госпитализации составляло 6,9 ммол/л (результат исследования негемолизированной сыворотки крови в амбулаторных условиях). Результаты других лабораторных исследований были в пределах нормы. Содержание калия в сыворотке крови в течение всего периода госпитализации находилось в пределах физиологических колебаний 3,9-4,5 ммол/л (норма 3,5-5,0 ммол/л). При выяснении причин разницы в результатах исследования, было установлено, что забор крови в амбулаторных условиях осуществлялся после наложения жгута на плечо и сжатия кисти в кулак, в то время как в стационаре - из постоянно-го сосудистого катетера (Don BR, 1990). Причиной псевдогиперкалиемии было повторяющееся сжимание/разжимание кулака (при наложенном жгуте) для ускорения набухания вен. Сокращение мышц предплечья способствовало деполяризации клеточных мембран и высвобождению калия из мышечных волокон (Narayanan S, 2000; Don BR, 1990).

У здорового человека в результате сжимания кулака при проведении процедуры венопункции может происходить увеличение концентрации калия в крови на 1-2 ммол/л (максимально на 2,7 ммол/л) (Skinner SL, 1961).

#### Случай из практики №2

У 40-летнего пациента уровень калия в крови при госпитализации составлял 8,0 ммол/л (при исследовании негемолизированной сыворотки крови). Лечение, направленное на снижение уровня сывороточного калия, оказалось безуспешным, так как его концентрация после проведенной терапии составляла 7,5 ммол/л. У пациента появились: спутанное сознание, судорожные сокращения мышц, рвота. Содержание калия в цельной крови по результатам анализа, назначенного лечащим врачом, составило 2,7 ммол/л. На основании результатов исследования врач отменил терапию, направленную на снижение концентрации сывороточного калия. При исследовании клинического анализа крови количество лейкоцитов составило в среднем  $20 \times 10^9/\text{л}$  (норма  $4,5 \times 11,0$ ), тромбоцитов -  $480 \times 10^9/\text{л}$  (норма 150-350).

Причиной повышенного уровня сывороточного калия при исследовании негемолизированной сыворотки крови явился лизис тромбоцитов и высвобождение калия в процессе центрифугирования. Однако при исследовании цельной крови тромбоциты были интактными (не лизированными) и содержание калия, определенное при помощи ион-селективных электродов, соответствовало истинному уровню. Пациенту с фактически нормальной концентрацией калия в сыворотке крови, проводилась ошибочная терапия, направленная на снижение его ложно высокого уровня.

#### Случай из практики №3

75-летняя пациентка была госпитализирована в стационар в состоянии спутанного сознания. У нее были отмечены серьезные нарушения электролитного баланса: содержание в сыворотке крови натрия составляло 162 ммол/л (норма 135-145 ммол/л), содержание хлора - 125 ммол/л (норма 100-108 ммол/л).

Через 3 дня после госпитализации уровни натрия и хлора в сыворотке крови нормализовались, состояние пациентки улучшилось. При выписке из стационара она высказала неудовлетворенность качеством больничного питания (отсутствием в рационе супов, которым она обычно отдавала предпочтение - курино-овощного, томатного и томатно-беконного).

Фактически гипернатремия и гиперхлоремия у пациентки были вызваны потреблением супов с избыточным содержанием поваренной соли. Содержание натрия в цельной крови составляло 1338-1873 ммол/л; что, даже после гемодилюции, привело к увеличению концентрации натрия и хлора в сыворотке крови до 162 и 125 ммол/л, соответственно. Причиной спутанности сознания явился гиперосмотический шок, развившийся в результате гипернатриемии, приведшей к дегидратации клеток головного мозга (Fujiwara P, 1985).

#### Случай из практики №4

В стационар поступила 85-летняя пациентка с анемией, гематологические показатели которой были следующими: уровень гемоглобина 10,3 г/дл (или 6,4 ммол/л) (норма для женщин - 12,0-16,0 г/дл или 7,4-9,9 ммол/л), количество лейкоцитов -  $9,2 \times 10^9/\text{л}$  (норма 4,5-11), тромбоцитов -  $354 \times 10^9/\text{л}$  (норма 150-350  $\times 10^9/\text{л}$ ). Через 1 неделю уровень гемоглобина стал 22,9 г/дл (14,2 ммол/л), количество лейкоцитов -  $3,7 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоцитов -  $78 \times 10^9/\text{л}$ .

Для выявления отклонений от нормы исследование повторяли несколько раз. Только при проведении анализа в четвертый раз были получены результаты, аналогичные результатам при поступлении: уровень гемоглобина - 10,2 г/дл (или 6,3 ммол/л), количество лейкоцитов -  $8,6 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоцитов -  $355 \times 10^9/\text{л}$ . Причиной расхождения результатов было избыточное заполнение пробирки кровью (во время ее взятия для исследования), из-за чего не происходило тщательного перемешивания крови в шейкере с качающейся платформой.

При проведении анализа в четвертый раз свободный объем пробирки был достаточным для осуществления тщательного перемешивания крови (Pewarchuk W, 1992).

#### Случай из практики №5

Госпитализирована 38-летняя женщина, биохимик по профессии, проводившая исследования с использованием экспериментальных животных. Получены следующие результаты анализов ее крови. Уровень сывороточного тироксина (Т4) составил 180 ммол/л (норма 58-140). Уровень свободного Т4 - 19,3 пмоль/л (норма 9,0-24,5), уровень ТТГ-15 Ед/л (0,5-5,0). По данным повторного исследования, проведенного в другой лаборатории с использованием другого метода, уровень ТТГ был в пределах нормы (4,0 Ед/л). Ложно-повышенный уровень ТТГ у пациентки был связан с образованием человеческих антимышиных антител (НАМА). При количественном иммуноферментном анализе НАМА могут интерферировать, связываясь одновременно с мечеными моноклональными антителами в конъюгате и антителами, входящими в со-

став иммуносорбента, обуславливая, таким образом, ложноположительный результат. Или, если НАМА находятся в избытке, они связываются с моноклональным антителом в конъюгате, препятствуя связыванию меченых антител с иммунным комплексом, и тем самым, обуславливают ложнонегативный результат. По всей вероятности, повышенный уровень ТТГ можно объяснить недостаточным количеством меченых иммуноглобулинов мыши в реактиве теста, необходимых для полной абсорбции НАМА (Narayanan S, 2000).

#### Случай из практики №6

У 59-летней пациентки, получавшей лечение препаратом из группы ингибиторов холинэстеразы, электролитный состав крови был следующим. Уровень натрия - 140 ммол/л, калия - 4,2 ммол/л, хлора - 114 ммол/л и бикарбоната - 34 ммол/л (норма - 22-46). Значение анионного интервала было отрицательным, что теоретически невозможно. При дальнейшем исследовании было установлено, что пациентке был назначен препарат - пиридостигмина бромид (из группы ингибиторов холинэстеразы). В связи с тем, что ион-селективный электрод, использовавшийся для определения уровня хлора, одинаково чувствителен и к бромиду, уровень хлора оказался повышенным, чем было обусловлено отрицательное значение анионного интервала (Rothenberg DM, 1990).

#### Случай из практики №7

60-летний мужчина, страдавший андрогенной алопецией, принимал лекарственный препарат для усиления роста волос. До лечения этим препаратом уровень простата-специфического антигена (ПСА) у него составлял 10 нг/л (норма 0,0-4,0), позднее уровень ПСА стал 4,5 нг/л. Результаты других лабораторных анализов были в норме. Лекарственный препарат (финастерид), который принимал пациент, препятствует превращению тестостерона в дигидротестостерон, эффективен при доброкачественной гиперплазии (аденомы) простаты (ДГП) у пожилых мужчин и способствует снижению уровня ПСА на 50 % (Oesterling JE, 1998).

В завершение данного обзора авторы приводят три наглядных примера типичных ошибок на преаналитическом этапе исследования.

1). Электролитный состав крови у пациента с уровнем глюкозы выше 55,5 ммол/л (1000 мг/дл) при норме 3,9-6,1 ммол/л (70-110 мг/дл) был следующим: уровень натрия—81 ммол/л, калия—2,3 ммол/л, хлора—48 ммол/л, бикарбоната—18 ммол/л. Выяснилось, что внутривенное вливание глюкозы и забор крови для исследования производился при пункции вен одной и той же руки, вызывая дилуционный эффект и уменьшение в результате этого концентрации электролитов.

2). У 43-летнего мужчины выявлены отклонения от нормы в показателях лабораторных анализов при исследовании негемолизированной сыворотки: уровень щелочной фосфатазы составлял 5 Ед/л (0,08 мккат/л) (норма - 45-115 Ед/л; 0,75-1,92 мккат/л), кальция—0,5 ммоль/л (2,0 мг/дл) (норма 2,1-2,6 ммол/л; 8,5-10,5 мг/дл) и уровень калия - 22,0 ммоль/л. При дальнейшем исследовании было обнаружено, что плазма была получена из крови, собранной в пробирку с наполнителем калий—ЭДТА. Образовались хелатные соединения ЭДТА с магнием и цинком (необходимые для проявления каталитической активности щелочной фосфатазы), в связи с чем наблюдалась низкая активность щелочной фосфатазы. ЭДТА может связывать также и кальций с образованием хелатных соединений, но

это часто недооценивается. Использование калий - ЭДТА приводит к резкому повышению концентрации калия до физиологически невозможного уровня.

3). И, наконец, при исследовании образца, хранившегося в выходные дни в холодильнике, были получены следующие результаты: уровень натрия составил 116 ммоль/л, калия—27,0 ммоль/л, хлора—102 ммоль/л, бикарбоната—26 ммоль/л, глюкозы—2,7 ммоль/л (48 мг/дл). Кровь в пробирке, хранившейся в холодильнике свернулась, это привело к угнетению натрий-калиевой АТФ-азы, что способствовало выходу ионов калия из клеток и поступлению ионов натрия в клетки. При хранении в холодильнике продолжался и процесс поглощения глюкозы клетками, в результате чего были получены ложно-низкие показатели концентрации глюкозы в крови.

#### Выводы.

Преаналитический этап оказывает существенное влияние на качество результатов лабораторного исследования. Осознание значимости этой проблемы привело к попыткам стандартизации преаналитического этапа. Разработка и внедрение стратегии выявления и предупреждения ошибок на преаналитическом этапе исследования является необходимым условием для обеспечения качества всего лабораторного процесса.

## СПИСОК АББРЕВИАТУР

<b>АЗЩЖ</b>	аутоиммунные заболевания щитовидной железы	<b>ОШ</b>	отношение шансов
<b>Анти-ТГ (ТgAb)</b>	антитела к тиреоглобулину	<b>ППЗ</b>	положительное прогнозируемое значение
<b>Анти-ТПО (ТРОAb)</b>	антитела к тиреоидной пероксидазе	<b>ПСА</b>	простатаспецифический антиген
<b>Анти-рТТГ (ТРАb)</b>	антитела к рецептору тиреотропного гормоны	<b>ПСА D</b>	индекс плотности простатаспецифического антигена
<b>БААРВТ</b>	высокоактивная антиретровирусная терапия	<b>ПЦР</b>	полимеразная цепная реакция
<b>ВГВ (HBV)</b>	вирус гепатита В	<b>РПГА</b>	реакция пассивной гемагглютинации
<b>ВГС (HCV)</b>	вирус гепатита С	<b>РПЖ</b>	рак предстательной железы
<b>ВИЧ (HIV)</b>	вирус иммунодефицита человека	<b>СКК</b>	метод сухой капли крови
<b>ВКЭ</b>	вирус клещевого энцефалита	<b>СМЖ</b>	спинномозговая жидкость
<b>ГЖХ</b>	газо-жидкостная хроматография	<b>Т3</b>	трийодтиронин
<b>ДГП</b>	доброкачественная гиперплазия простаты	<b>Т4</b>	тироксин
<b>ДИ</b>	доверительный интервал	<b>ТТГ (TSH)</b>	тиреотропный гормон
<b>ИА</b>	индекс avidности	<b>ТРУЗИ</b>	трансректальное ультразвуковое исследование
<b>ИБ</b>	иммунный блоттинг (Western-blot)	<b>ЦМВ</b>	цитомегаловирус
<b>ИРМА</b>	иммунорадиометрический анализ	<b>ЦМВИ</b>	цитомегаловирусная инфекция
<b>ИФА</b>	иммуноферментный анализ	<b>ЦНС</b>	центральная нервная система
<b>ИФТ</b>	иммунофлуоресцентный тест	<b>ЩЖ</b>	щитовидная железа
<b>ИППП</b>	инфекции передаваемые половым путем	<b>FT4I</b>	индекс свободного тироксина
<b>КИМ</b>	концентрация йода в моче	<b>АНИС</b>	(Australian Health Insurance Commission)—Австралийская комиссия по медицинскому страхованию
<b>Л</b>	лейкоциты	<b>CDC</b>	(Centers for Disease Control)- Центр по контролю и профилактике заболеваний, США
<b>МИК</b>	минимальная ингибирующая концентрация	<b>NACB</b>	(National Academy of Clinical Biochemistry)—Национальная академия клинической биохимии, США
<b>МОКК</b>	метод однослойной культуры клеток	<b>NAT</b>	(nucleic acid amplification)-методы амплификации нуклеиновых кислот
<b>ОПЗ</b>	отрицательное прогнозируемое значение	<b>FDA</b>	(Food and Drug Administration)—Управление по контролю продуктов и лекарств, США
<b>ОР</b>	относительный риск	<b>НАМА</b>	(Human AntiMouse Antibody)—человеческие антимышиные антитела

# КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

## Региональные предприятия

<b>Москва</b>	ООО "Диагностические системы—Столица" 117405, Москва, ул. Дорожная, д. 60 Б тел. (495) 411-96-84, 411-96-85, 411-96-86 e-mail: ds-stolica@bk.ru kvd@npods.ru
<b>Санкт-Петербург</b>	ООО "Диагностические системы—СПб" 194044, Санкт-Петербург, пр. Большой Сампсониевский, д. 66, литер А тел./ факс (812) 702-17-13, 702-17-14 systema@telros.net
<b>Красноярск</b>	ООО "Диагностические системы—Сибирь" 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 16 д тел./ факс (3912) 78-19-83, 54-16-55, 54-14-66, 54-17-58 ds-siberia@scn.ru
<b>Республика Украина</b>	ООО "Диагностические системы—Украина" 04210, Киев, а/я 119 тел. (10-380-44) 501-90-80, тел./факс (10-380-44) 501-91-00 ua@npods.ru
<b>Республика Казахстан</b>	ТОО "Диагностические системы—Казахстан" тел. +7-777-265-60-00 kz@npods.ru
<b>Республика Узбекистан</b>	ООО "Диагностические системы—Бактрия" 100015, Ташкент, 1-й тупик Муками, д. 7, офис 312 тел./факс (998 71) 152-23-15, 152-23-16 тел.: (998 97) 704-06-40, 704-06-30 ds-baktriya@mail.ru
<b>Ростов-на-Дону</b>	Обособленное подразделение 344068, г. Ростов-на-Дону пр. М. Нагибина, д. 33 а/47, 3 этаж, офис 5 тел./факс (863) 292-41-01, моб. 8-918-555-66-22 RostovDon@npods.ru
<b>Чита</b>	Обособленное подразделение 672000, г. Чита, ул. 9 января, д. 6, офис 103 тел. (3022) 35-27-91, chitanpods@mail.ru classik_info@mail.ru

## Региональные дистрибьюторы

<b>Благовещенск</b>	ООО "Вира" тел. (4162) 53-62-94, 37-21-33 факс (4162) 53-63-77 vira@tsl.ru
<b>Новосибирск</b>	ООО "Промикс" тел. (3832) 36-07-09; факс (3832) 36-01-66
<b>Казань</b>	ООО "Компания Медбиофарм" тел. (8432) 73-03-93
<b>Краснодар</b>	ООО "Эталон" тел. (861) 254-18-93, 210-98-52, 210-98-54
<b>Пермь</b>	ООО "БИОТЕХ" тел. (3422) 37-17-65, 37-16-73, 34-45-28
<b>Республика Беларусь</b>	СООО "Хема-Тест" Минск тел. (0172) 11-80-39
<b>Республика Молдова</b>	DAC-Spectromed s.r.l, 2025, Кишинев, ул. Тестемичану, д. 20 тел. (+37322) 73-99-61, 73-99-68, факс (+37322) 72-75-22 office@dacspectromed.com www.dacspectromed.com
<b>Республика Кыргызстан</b>	СКР ОсОО "Юни-Т-Реактив-Фарма" 720026, Бишкек, ВДНХ СЭЗ "Бишкек", пр. Мира, д. 303 тел./факс (996-312) 55-11-90, 55-13-98 unit_rf@mail.elcat.kg
<b>Республика Таджикистан</b>	ООО "Диагностикум" Душанбе тел./факс (992-372) 21-68-74, тел. 8-10-992-917-780-807 ds57@mail.ru
<b>Республика Узбекистан</b>	НПП "INSEP" 700090, Ташкент, ул. М. Таробий, д. 29 а тел./факс (998-71) 152-54-84 barlas@mail.ru

## Нижний Новгород



### Главный офис:

ООО «НПО «Диагностические системы»  
603093, Нижний Новгород  
ул. Яблоневая, д. 22  
тел. (831) 434-86-83

### Департамент продаж:

ул. Н-В. Набережная, д. 9  
тел. (831) 461-92-02  
тел/факс (831) 467-82-15, 467-82-16, 467-82-17  
info@npods.nnov.ru selling@npods.ru  
http://www.npods.ru

## Региональные медицинские представители

Белгород	Калатура Игорь Анатольевич	тел. (4722) 32-94-29 моб. 8905-040-68-04 kialab@belmail.ru
Воронеж	Лежнина Ирина Васильевна	тел. (4732) 75-78-94, факс (4732) 26-52-06 моб. +7910-749-78-94, Irena17965@yandex.ru
Воронеж	Генералов Кирилл Вадимович	тел./факс (4732) 71-39-37, ds-vrn@mail.ru
Екатеринбург	Капизова Альбина Салимовна	тел. 8-922-206-28-06, albinads@yandex.ru
Ижевск	Кузьмин Алексей Евгеньевич	моб. 8-912-856-47-11, npods@udmnet.ru
Казань	Шигабутдинов Айрат Исламович	тел. (843) 238-76-55 моб. 8-917-254-80-14 ds-kazan@mail.ru
Краснодар, Майкоп	Михайлова Ирина Николаевна	тел. (861) 252-22-90 моб. 8-918-488-35-35 Irina0114@yandex.ru
Курск	Гапонов Владимир Станиславович	тел. 8 920 263 96 41, тел. дом. +7 (4712) 50-44-76 garonov1979@yandex.ru
Липецк, Тамбов	Останин Игорь Сергеевич	тел. (4742) 37-76-53 моб. 8-903-643-76-53 ostanin@lipetsk.ru
Новосибирск	Наумова Светлана Владимировна	тел. (3832) 20-32-84 моб. 8-903-903-32-75 novosib-ds@ngs.ru
Оренбург	Гильмутдинов Рустам Гаптрауфович	тел. (3532) 55-32-82, dsrust@yandex.ru
Омск	Злобина Алла Анатольевна	тел./факс (3812) 36-63-88 моб. 8-913-961-02-35 Alla-zl@yandex.ru
Орел	Белосуов Константин Сергеевич	моб. 8-909-228-66-48 bkso@orel.ru
Пермь	Ямщикова Ольга Владимировна	моб. 8-909-106-11-97 8-919-492-33-00 olga_1903@inbox.ru
Республика Беларусь	Ильенков Юрий Валерьевич	тел. (+37529) 399-49-92 mymba@tut.by
Самара	Викторова Елена Александровна	тел. (846) 264-00-38 моб. 8-927-207-63-70 vikelena@yandex.ru
Саратов	Измайлова Елена Александровна	тел. (8452) 55-10-24 моб. 8-917-201-85-56 helenai@mail.ru
Ставрополь	Корольков Сергей Анатольевич	тел./факс (8652) 32-22-56 моб. 8-918-740-56-56 desana@mail.ru
Тюмень	Полуэктова Светлана Юрьевна	тел./факс (3452) 42-80-57, тел. 8-922-269-31-35 dstmn@mail.ru
Улан-Удэ	Хамаев Борис Иосифович	тел./факс (3012) 42-58-98, 64-88-93, ds-bur@mail.ru
Ульяновск	Гаврилина Наталья Александровна	моб. 8-905-036-13-19 nataiaalex2006@rambler.ru
Уфа	Анисимов Олег Анатольевич	тел. 8-901-442-39-05 naufal@ufanet.ru
Уфа	Бурханова Гузель Фанилевна	тел. (347) 232-91-07 моб. 8-927-23-900-83 guzel_mur@mail.ru
Челябинск	Юлдашев Ринат Ахметжанович	тел. 8-351-725-95-59 моб. +7912-793-95-59 t4free@mail.ru